



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:**

**«Ο βιοδείκτης *actinin B* στην παλίνδρομη και εξωμήτρια κύηση»**

*Ζαφείρη Αθανασία*  
Βιολόγος

**ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ**  
**ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ**  
**ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

**Επιβλέπουσα:** Καθηγήτρια Τσέζου Ασπασία

**Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή :**

Καθηγήτρια Τσέζου Ασπασία

Αν. Καθηγητής Δαπόντε Αλέξανδρος

Επ.Καθηγητής Γκαράς Αντώνιος

*Λάρισα, Σεπτέμβριος 2015.*

## Περίληψη

Η ακτιβίνη B μαζί με τις ακτιβίνες A, AB, C και E καθώς και τις ινχιμπίνες A και B, συνιστούν την οικογένεια των ακτιβινών, η οποία αποτελεί μέρος της υπεροικογένειας πρωτεϊνών του TGFβ. Οι ακτιβίνες εμφανίζοντας ευρεία έκφραση σχεδόν σε κάθε κυτταρικό τύπο, σηματοδοτούν μέσω των υποδοχέων τους επηρεάζοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση και την απόπτωση. Κύριοι ρυθμιστές της δράσης τους θεωρείται ότι είναι οι ανασταλτικές της σηματοδότησής τους πρωτεΐνες ινχιμπίνες καθώς και η δεσμευτική των ακτιβινών πρωτεΐνη φολλιστατίνη. Στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα, οι ακτιβίνες είναι περισσότερο γνωστές για την ικανότητά τους να επάγουν την έκκριση της FSH από τα κύτταρα της υπόφυσης, ενώ η έκφραση των πρωτεϊνών αυτών τόσο στα κύτταρα στρώματος του ενδομητρίου, όσο και στο επιθήλιο των σαλπίγγων τις εμπλέκει περαιτέρω και στον εμβryo-μητρικό διάλογο κατά την εμφύτευση και εισβολή της αναπτυσσόμενης τροφοβλάστης. Σε σχέση με τις έκτοπες και τις παλίνδρομες κύσεις, περισσότερο μελετημένη είναι η ακτιβίνη A, η οποία έχει δώσει αντικρουόμενα αποτελέσματα μέχρι στιγμής, ενώ τα δεδομένα για την ακτιβίνη B είναι ελάχιστα. Στην παρούσα εργασία έγινε μελέτη δειγμάτων ορού από γυναίκες με έκτοπο, παλίνδρομη και φυσιολογική κύηση, προκειμένου να προσδιοριστεί εάν η ακτιβίνη B είναι ανιχνεύσιμη στα δείγματα αυτά και περαιτέρω να διευκρινιστεί εάν η πρωτεΐνη αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης για τον διαχωρισμό μεταξύ των παραπάνω καταστάσεων αρχόμενης κύησης. Βρέθηκε ότι η ακτιβίνη B εμφανίζει αυξημένα επίπεδα στον ορό γυναικών με έκτοπο και παλίνδρομη κύηση σε σχέση με γυναίκες που έχουν φυσιολογική ενδομήτρια κύηση, καθώς και ότι τα επίπεδα της ακτιβίνης B μπορούν να διαχωρίσουν μία εκδράμουςα κύηση σε σχέση με μία φυσιολογική ενδομήτρια, υποδεικνύοντας ότι η ακτιβίνη B χρήζει περαιτέρω έρευνας και από άλλες μελέτες ως ένας πιθανός βιοδείκτης για τον διαχωρισμό των έκτοπων και των παλίνδρομων κύσεων σε σχέση με τις φυσιολογικές ενδομήτριες αρχόμενες κύσεις.

## Abstract

The activin family comprises of activins B, A, AB, C, E and inhibins A and B, and belongs to the TGFβ superfamily. Activins are widely expressed in almost every cellular type and through signaling pathways, they can affect cell proliferation, differentiation and apoptosis. Inhibins, which are proteins that inhibit activin signaling, as well as the activin binding protein, follistatin, are considered to be the main activin regulators. When it comes to the human female reproductive system, activins are chiefly known for their ability to induce FSH secretion from the pituitary. Furthermore, activins are involved in the embryo-uterine dialogue during implantation and trophoblast invasion, due to their expression in the endometrial stroma and the fallopian tubal epithelium. To this day, there are some conflicting data about the role of activin A in ectopic pregnancies and missed abortions, whereas only few about activin B. In this current dissertation, serum samples of women with ectopic pregnancies, missed abortions and normal intrauterine pregnancies were studied in order to determine activin's B traceability in these serum samples, as well as to specify whether this particular protein could be used as a biomarker for the discrimination between ectopic pregnancies, missed abortions and normal intrauterine pregnancies. We found that activin B had increased serum levels in ectopic pregnancies and missed abortions, compared to those observed in normal intrauterine pregnancies. We also found that activin B serum levels could separate ectopic pregnancies and missed abortions from normal pregnancies, which indicates that further studies are needed to investigate the potential role of activin B as a biomarker for ectopic pregnancies and missed abortions.

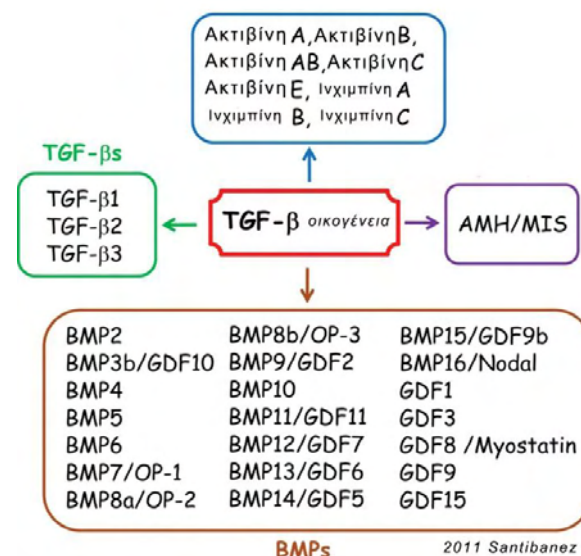
## Περιεχόμενα

<b>Μέρος Α</b>	<b>Σελ</b>
Οικογένεια των ακτιβινών και ινχιμπινών .....	1
Δομή.....	3
Σηματοδότηση.....	5
Ρύθμιση.....	9
<b>Μέρος Β</b>	
Ρόλοι των ακτιβινών στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα .....	14
Επίπεδα κατά τη διάρκεια του κύκλου και στην κύηση.....	15
Σάλπιγγες.....	18
Ενδομήτριο.....	21
Έκφραση στο ενδομήτριο.....	22
Έμμηνος ρύση και επιδιόρθωση ενδομητρίου.....	24
Αγγειογένεση ενδομητρίου.....	25
Ανοσολογική ρύθμιση περιβάλλοντος μήτρας.....	26
Φθαρτοποίηση ενδομητρίου.....	27
Ρύθμιση αρχόμενης εμβρυικής ανάπτυξης.....	29
<b>Πλακούντας</b> .....	30
Ρύθμιση τροφοβλάστης.....	31
Ρύθμιση ανάπτυξης και λειτουργίας πλακούντα .....	33
<b>Μέρος Γ</b>	
Εξωμήτρια και παλίνδρομη κύηση.....	35
Διάγνωση.....	39
Θεραπεία.....	43
Βιοδείκτες στην εξωμήτρια και παλίνδρομη κύηση.....	45
Οι ακτιβίνες ως βιοδείκτες.....	50
Πιθανοί μηχανισμοί δράσης ακτιβινών.....	55
<b>Σκοπός</b> .....	59
<b>Μέρος Δ</b>	
Υλικά και Μεθοδολογία.....	60
<b>Μέρος Ε</b>	
Αποτελέσματα.....	61
<b>Μέρος ΣΤ</b>	
Συμπεράσματα.....	67
<b>Βιβλιογραφία</b> .....	69

## Μέρος Α

### Οικογένεια των ακτιβινών και ινχιμπινών

Η υπερικογένεια πρωτεϊνών του TGFβ (transforming growth factor) αποτελεί μία δομικά συντηρημένη αλλά λειτουργικά ποικίλη ομάδα πρωτεϊνών (Knight, et al. 2012), η οποία περιλαμβάνει περισσότερα από 40 μέλη (Santibanez, et al. 2011) με ευρεία έκφραση σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους τόσο κατά την αναπτυξιακή διαδικασία όσο και στον ενήλικα οργανισμό (Tirado-Rodriguez, et al. 2014). Οι πρωτεΐνες της υπερικογένειας αυτής έχουν βρεθεί σε πολλά είδη (Tirado-Rodriguez, et al. 2014) και παίρνουν μέρος στη ρύθμιση μιας πλειάδας βιολογικών διαδικασιών όπως στην εμβρυική ανάπτυξη και διαφοροποίηση ενήλικων βλαστικών κυττάρων (Santibanez, et al. 2011), στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και απόπτωση, στην ανοσολογική απόκριση και φλεγμονή, στην επιδιόρθωση ιστών και ομοιοστάση (Tirado-Rodriguez, et al. 2014), καθώς και στον καρκίνο (Santibanez, et al. 2011). Στην υπερικογένεια αυτή, οι πρωτεΐνες υποκατηγοριοποιούνται με βάση τις δομικές τους ομοιότητες στις ομάδες του TGFβ, των BMP (bone morphogenetic proteins), των GDF (growth differentiation factor), των ακτιβινών και ινχιμπινών (Santibanez, et al. 2011) (Knight and Glister 2006), των GDNF (glial cell-derived neurotrophic factor) (Knight and Glister 2006), (Kwiatkowski, et al. 2014), καθώς και της AMH (anti-Mullerian hormone), (Santibanez, et al. 2011). **Εικόνα 1** (Santibanez, et al. 2011).



**Εικόνα 1:** Τα μέλη της υπερικογένειας του TGFβ (Santibanez, et al. 2011).

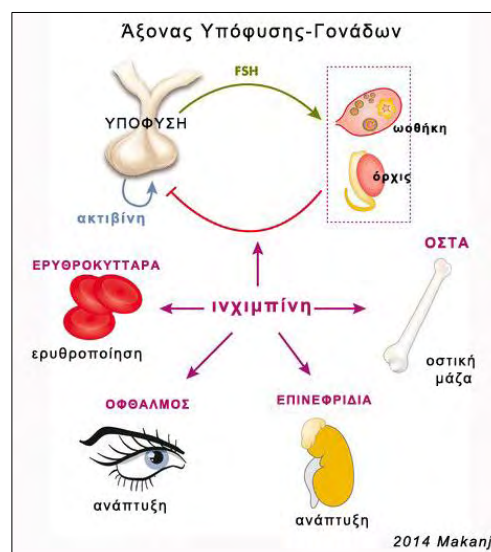
Κοινά χαρακτηριστικά των μελών της υπερικογένειας αυτής αποτελούν η σύνθεσή τους ως πρόδρομα μόρια που χρειάζονται ενζυμική πέψη ώστε να δημιουργηθεί η ώριμη τελική πρωτεΐνη, μία συντηρημένη περιοχή κυστεϊνών (cysteine knot) η οποία συμμετέχει στο σχηματισμό δισουλφιδικού δεσμού μεταξύ των διμερών της ώριμης πρωτεΐνης (Gold and Risbridger 2012), καθώς και το γεγονός ότι το σύνολο των μελών -με την εξαίρεση των GDNF και των ινχιμπινών- λειτουργούν ως συνδέτες σε μεμβρανικούς υποδοχείς για την επαγωγή σηματοδότησης ενδοκυττάρων μονοπατιών (Knight and Glister 2006).

Η ομάδα πρωτεϊνών του TGFβ, ο οποίος πήρε το όνομά του από την ικανότητά του να επάγει την ανάπτυξη ινοβλαστών, περιλαμβάνει 3 ισομορφές στα θηλαστικά, τις πρωτεΐνες TGFβ1,2,3 (Santibanez, et al. 2011). Η ομάδα των BMP περιλαμβάνει τα περισσότερα μέλη και αρχικά πήρε το όνομά της χάρη στην ικανότητα των παραγόντων αυτών να επάγουν την έκτοπη δημιουργία οστού σε κύτταρα μυών. Οι πρωτεΐνες της ομάδας αυτής έχουν ευρεία δράση, είναι όμως κυρίως γνωστές για την συμμετοχή τους στην ανάπτυξη και επιδιόρθωση

των οστών (Carreira, et al. 2014). Στην ομάδα αυτή ανήκει επίσης και η πρωτεΐνη Nodal που έχει σημαντικό ρόλο κατά την εμβρυογένεση και καθιέρωση του κυτταρικού πεπρωμένου (Wang and Tsang 2007) καθώς και τα 11 μέλη των GDF (Santibanez, et al. 2011). Η AMH ή MIS (Mullerian inhibiting substance), είναι μία πρωτεϊνική ορμόνη των γονάδων που πήρε το όνομά της από την επαγωγή της υποστροφής των πόρων του Muller κατά τη διαφοροποίηση της γονάδας σε όρχι κατά την εμβρυογένεση και είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και λειτουργία των γονάδων και στα δύο φύλα (Santibanez, et al. 2011) ,(McLennan and Pankhurst 2015).

Η οικογένεια των ακτιβινών (κυριότερα μέλη ακτιβίνη A, B, AB) και των δομικά σχετιζόμενων ινχιμπινών (ινχιμπίνη A, B), πήρε το όνομά της από την ιδιότητα των πρωτεϊνών αυτών να επάγουν και να αναστέλλουν αντίστοιχα την έκκριση της FSH (follistatin stimulating hormone) από κύτταρα πρόσθιας υπόφυσης σε καλλιέργεια (Hedger and de Kretser 2013). Οι ακτιβίνες έχουν ευρεία έκφραση σε πολλούς ιστούς, μεταξύ των οποίων ο εγκέφαλος, οι γονάδες, οι πνεύμονες, η καρδιά, το πάγκρεας (Gold and Risbridger 2012) και εμπλέκονται στη ρύθμιση πλήθους διαδικασιών όπως στην γοναδική λειτουργία και ορμονική ομοιοστάση, στον πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων (Tsuchida, et al. 2009), στην ερυθροποίηση και διαφοροποίηση των ανοσολογικών κυττάρων, στην ανοσολογική απόκριση και φλεγμονή (Hedger and de Kretser 2013), στον μεταβολισμό της γλυκόζης (Xia and Schneyer 2009), σε λειτουργίες του κεντρικού νευρικού συστήματος καθώς και στην ανάπτυξη και μετάσταση των καρκινικών κυττάρων (Tsuchida, et al. 2009).

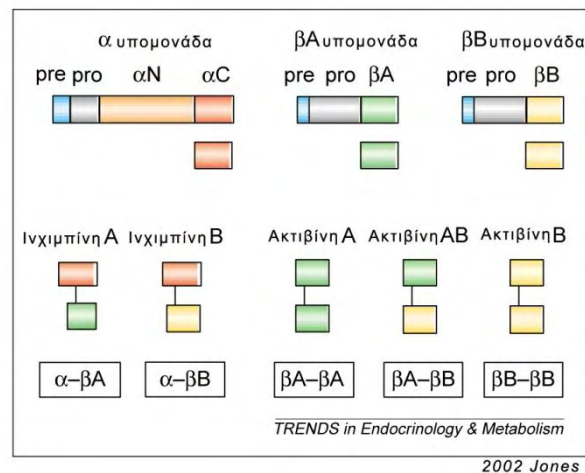
Οι ινχιμπίνες παράγονται κυρίως από τις γονάδες και δευτερευόντως από τα επινεφρίδια και άλλους ιστούς (Phillips, et al. 2009), αφού ζώα με γοναδεκτομή παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα FSH και μειωμένα επίπεδα ινχιμπινών (Shelling 2012). Η δράση των πρωτεϊνών αυτών έγκειται κατά κύριο λόγο στον ανταγωνισμό της δράσης των ακτιβινών και πέραν της πλέον μελετημένης τους ιδιότητας να ρυθμίζουν ενδοκρινικά και παρακρινικά τον άξονα ΥΥΓ (υποθάλαμος-υπόφυση-γονάδες), μία πρόσφατη διεξοδική ανασκόπηση αναφέρει την εμπλοκή τους και σε άλλες διαδικασίες (όπως η ανάπτυξη και διαφοροποίηση των επινεφριδίων, ο μεταβολισμός των οστών και η ανάπτυξη του αμφιβληστροειδούς) στις οποίες οι ινχιμπίνες και οι ακτιβίνες εμφανίζουν αντίρροπη δράση (Makanji, et al. 2014), επισημαίνοντας με αυτόν τον τρόπο την πολυπλοκότητα των διαδικασιών στις οποίες παίρνει μέρος η οικογένεια των ακτιβινών. **Εικόνα 2** (Makanji, et al. 2014).



**Εικόνα 2 :** Οι ρόλοι των ινχιμπινών στις γονάδες και σε άλλους ιστούς (Makanji, et al. 2014).

## Δομή

Στην οικογένεια των ακτιβινών και ινχιμπινών συμμετέχουν κυρίως 3 γονίδια, το γονίδιο *inha* που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 2q33-q36 και κωδικοποιεί την άλφα υπομονάδα και τα γονίδια *inhba* (χρωμόσωμα 7p15-p13) και *inhbb* (χρωμόσωμα 2cen-q13) που κωδικοποιούν αντίστοιχα τις βήτα Α και βήτα Β υπομονάδες. Οι ινχιμπίνες αποτελούνται από διμερή των άλφα και βήτα υπομονάδων ενωμένων με δισουλφιδικό δεσμό, ενώ οι ακτιβίνες από διμερή των βήτα υπομονάδων ενωμένων με δισουλφιδικό δεσμό. Πιο συγκεκριμένα η ινχιμπίνη Α αποτελείται από την άλφα υπομονάδα και την βήτα Α αλυσίδα (α-βΑ), ενώ η ινχιμπίνη Β από την άλφα υπομονάδα και την βήτα Β αλυσίδα (α-βΒ). Αντίστοιχα, η ακτιβίνη Α αποτελείται από δύο όμοιες αλυσίδες βήτα Α (βΑ-βΑ), η ακτιβίνη Β από δύο βήτα Β αλυσίδες (βΒ-βΒ) και η ακτιβίνη ΑΒ από μία βήτα Α και μία βήτα Β αλυσίδα (βΑ-βΒ). (Makanji, et al. 2014; Shelling 2012). **Εικόνα 3** (Jones, et al. 2002).



**Εικόνα 3 :** Δομή των ακτιβινών και ινχιμπινών. Οι ακτιβίνες και οι ινχιμπίνες σχηματίζονται ως πρωτεΐνες που απαιτούν πρωτεολυτική διάσπαση για να δώσουν την ώριμη μορφή τους. Η ώριμη μορφή της άλφα υπομονάδας (αC) μπορεί να ενωθεί με την ώριμη μορφή των βήτα αλυσίδων βΑ και βΒ, δίνοντας τις ινχιμπίνες Α και Β. Οι ακτιβίνες Α και Β σχηματίζονται από ομοδιμερισμό των ώριμων βΑ και βΒ αλυσίδων, ενώ η ακτιβίνη ΑΒ από διμερισμό των ώριμων βΑ και βΒ (Jones, et al. 2002).

Τόσο η άλφα όσο και οι βήτα υπομονάδες παράγονται ως πρόδρομα μόρια τα οποία υφίστανται πρωτεολυτική πέψη κατά την ενδοκυττάρια φάση σύνθεσης των ακτιβινών και ινχιμπινών, μία διαδικασία απαραίτητη για τον σχηματισμό, αναδίπλωση και έκκριση των ώριμων διμερών πεπτιδίων, η οποία μεσολαβείται από τη δράση των πρόδρομων N-περιοχών τους (Makanji, et al. 2014; Walton, et al. 2012).

Η άλφα υπομονάδα, για την οποία φυλογενετικά δεδομένα δείχνουν ότι έχει προέλθει από τη βήτα (Drummond and Fuller 2012), αποτελείται από μία πρόδρομη N-περιοχή 232 αμινοξέων και μία ώριμη C-περιοχή 134 αμινοξέων και διαθέτει δύο σημεία πρωτεολυτικής πέψης. Το πρώτο σημείο πέψης βρίσκεται μέσα στην πρόδρομη N-περιοχή (pro αN) και δίνει γένεση στο αN πεπτίδιο (171 αμινοξέα) ενωμένο με το αC. Με την πέψη στο δεύτερο σημείο δημιουργείται το ώριμο αC πεπτίδιο. Αν και η πρωτεολυτική πέψη της άλφα υπομονάδας δεν είναι απαραίτητη για τη βιοδραστικότητα των ινχιμπινών (Makanji, et al. 2014; Walton, et al. 2012), σημαντικό ρόλο έχουν τόσο στη δημιουργία και όσο και στη βιολογική δράση των διμερών, δύο θέσεις N-γλυκοζυλίωσης οι οποίες βρίσκονται στην περιοχή αC και δίνουν γένεση στις μονογλυκοζυλιωμένες (31kDa) και διγλυκοζυλιωμένες (34kDa) ινχιμπίνες (Makanji, et al. 2014; Stenvers and Findlay 2010). Μοντέλα ζώων με έλλειψη (KO, knock out) ή υπερέκφραση (transgenic) της άλφα υπομονάδας, καταδεικνύουν τον σημαντικό ρόλο των

ινχιμπινών στη λειτουργία των γονάδων και στα δύο φύλα (παρουσίαση φαινοτύπων (Makanji, et al. 2014).

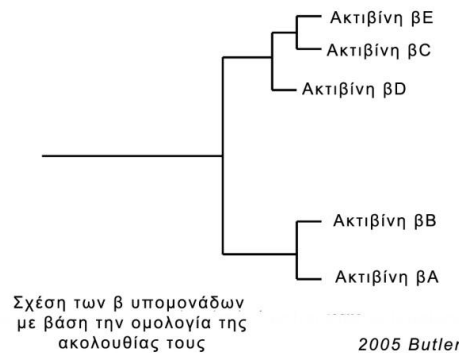
Η βήτα Α (βΑ) υπομονάδα έχει 65% ομολογία ακολουθίας με την βήτα Β υπομονάδα, ενώ οι ακτιβίνες Α και Β έχουν υψηλό ποσοστό συντήρησης μεταξύ του ανθρώπου και άλλων ειδών (97%) υποδηλώνοντας τη σημαντική ξεχωριστή λειτουργικότητα της κάθε μίας (Hedger and de Kretser 2013). Η βήτα Α (βΑ) υπομονάδα αποτελείται από μία πρόδρομη Ν-περιοχή με 290 αμινοξέα και μία ώριμη C-περιοχή 116 αμινοξέων, ενώ η βήτα Β (βΒ) υπομονάδα αντίστοιχα έχει 264 αμινοξέα στην πρόδρομη Ν-περιοχή και 115 στην ώριμη C-περιοχή (Walton, et al. 2012) με τις ώριμες C-περιοχές των βήτα Α και βήτα Β υπομονάδων να διαφέρουν κατά 42 αμινοξέα δίνοντας γένεση σε πεπτιδία όμοιου μοριακού βάρους 13kDa (Makanji, et al. 2014). Και οι δύο υπομονάδες έχουν μία θέση πέψης στο μόριό τους, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία των ώριμων C περιοχών μετά από υδρόλυση ή ενζυμική πέψη (Hedger and de Kretser 2013), μια διαδικασία απαραίτητη για τη βιοδραστικότητα των ακτιβινών (Makanji, et al. 2014).

Η βήτα Α (βΑ) υπομονάδα έχει επίσης μία θέση γλυκοζυλίωσης, η οποία όμως εντοπίζεται στην πρόδρομη Ν-περιοχή της και δεν φαίνεται να παίρνει μέρος στο σχηματισμό των διμερών της βήτα Α αλυσίδας (Antenos, et al. 2007). Επιπλέον η πρόδρομη περιοχή της βήτα Α υπομονάδας μπορεί να συνδέεται με τις HSPG (heparin sulfate proteoglycans) πρωτεογλυκάνες της εξωκυττάριας ουσίας (ECM, extra cellular matrix) και της πλασματικής μεμβράνης (Beckett, et al. 2015), μία ιδιότητα που ενδέχεται να αυξάνει τη συγκέντρωση της ακτιβίνης κοντά στη θέση δράσης της στα κύτταρα στόχους. Δεδομένα ωστόσο δείχνουν ότι η πρόδρομη περιοχή της βήτα Α υπομονάδας έχει χαμηλή συγγένεια σύνδεσης με το ώριμο πεπτιδίο, με αποτέλεσμα το σύνολο της ενεργής ακτιβίνης Α να βρίσκεται κυρίως με την ώριμη μορφή του διμερούς πεπτιδίου. Η ιδιότητα αυτή, της σύνδεσης με τις HSPG πρωτεογλυκάνες, λείπει από την πρόδρομη βήτα Β υπομονάδα λόγω της διαφορετικής της αλληλουχίας αμινοξέων (Walton, et al. 2012).

Και οι δύο υπομονάδες βήτα (βΑ και βΒ) έχουν βρεθεί να εκφράζονται σχεδόν σε κάθε κυτταρικό τύπο (Tsuchida, et al. 2009), με την βήτα Α να έχει υψηλότερη έκφραση στις ωοθήκες, όρχεις και προστάτη και την βήτα Β υπομονάδα να έχει υψηλότερη έκφραση στους όρχεις, προστάτη και υπόφυση στον άνθρωπο (mRNA, multi-chip array, (Gold and Risbridger 2012). Η παρουσία ωστόσο του mRNA των υπομονάδων δεν εγγυάται και την παρουσία των ώριμων πεπτιδίων, ενώ επιπλέον σημαντικές αναντιστοιχίες έχουν αναφερθεί μεταξύ των επιπέδων mRNA και πρωτεΐνης κυρίως για την ακτιβίνη Α. (Hedger and de Kretser 2013; Refaat, et al. 2008). Μοντέλα ζώων με έλλειψη (ΚΟ) της βΑ υπομονάδας, έλλειψη (ΚΟ) της βΒ υπομονάδας, διπλή έλλειψη (double KO) και των δύο βΑ,βΒ καθώς και υποκατάσταση της βΒ υπομονάδας σε βΑ ΚΟ (knock in), μαρτυρούν συνολικά ότι οι δύο αυτές υπομονάδες έχουν διαφορετικούς μη επικαλυπτόμενους ρόλους και επηρεάζουν σημαντικά την εμβρυογένεση όπως και τη γονιμότητα ( παρουσίαση φαινοτύπων σε (Makanji, et al. 2014; McDowall, et al. 2008).

Άλλες τρεις επιπλέον μορφές της υπομονάδας βήτα πέραν των βήτα Α και βήτα Β έχουν βρεθεί, δύο στον άνθρωπο (βC,βΕ ) και μία στο αμφίβιο *Xenopus laevis* (βD), αυξάνοντας έτσι τον αριθμό των πιθανών (ομο/ετερο) διμερών ακτιβίνης και ινχιμπίνης που μπορεί να σχηματίζονται. Οι υπομονάδες βC και βΕ απομονώθηκαν μέσω cDNA κλωνοποίησης από ηπατικά κύτταρα στον άνθρωπο (Hashimoto, et al. 2002; Hotten, et al. 1994) και αρχικά θεωρήθηκε ότι παρουσιάζουν ηπατο-ειδική έκφραση μόνο (Muttukrishna, et al. 2004b). Έκτοτε η έκφρασή τους έχει περιγραφεί και σε άλλους ιστούς ιδίως για την υπομονάδα βC (προστάτης, πλακούντας, μήτρα, ωοθήκες ) (Gold and Risbridger 2012), όπως και για την υπομονάδα βΕ (πλακούντας, τράχηλος, ενδομήτριο)(Mylonas, et al. 2010).

Η υπομονάδα βC εμφανίζει 51% και 53% ομοιότητα με τις βήτα A και βήτα B αντίστοιχα, ενώ η βE έχει 45% ομοιότητα με τις βήτα A και βήτα B (Muttukrishna, et al. 2004b). Μέχρι στιγμής τα δεδομένα είναι ελάχιστα για τις υπομονάδες αυτές, ωστόσο η βήτα C στον άνθρωπο έχει αναφερθεί να μπορεί να σχηματίζει διμερή με την βήτα A (βA-βC) και με την βήτα B (βB-βC) όπως και με τον εαυτό της (βC-βC) μειώνοντας έτσι τη σηματοδότηση της ακτιβίνης A (Gold and Risbridger 2012) και η βήτα E να σχηματίζει διμερή με την βήτα A (βA-βE) και την βήτα C (βC-βE) σε αρουραίους (Vejda, et al. 2002). Μελέτες σε μοντέλα ζώων ΚΟ για την βC και ΚΟ για την βE υπομονάδα, δεν ανέπτυξαν φανερή παθολογία υποδηλώνοντας ότι οι υπομονάδες αυτές ίσως να μην είναι απαραίτητες είτε οι λειτουργίες τους να υποκαθίστανται από άλλα μέλη της TGFβ οικογένειας (Gold and Risbridger 2012). **Εικόνα 4** (Butler, et al. 2005).



**Εικόνα 4 :** Σχέση των β υπομονάδων με βάση την ομοιότητα της ακολουθίας τους (Butler, et al. 2005).

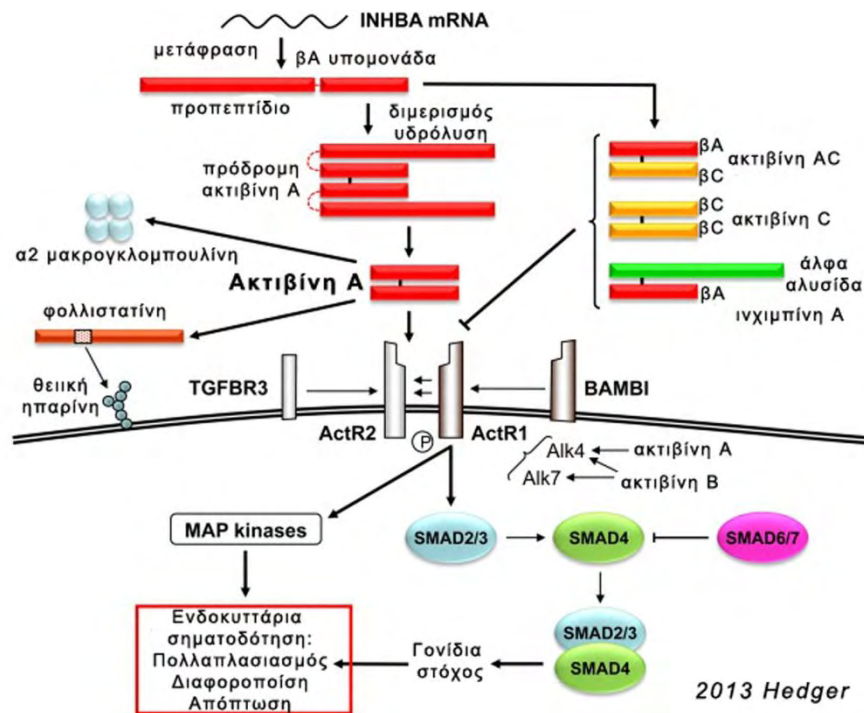
## Σηματοδότηση

Οι ακτιβίνες λειτουργούν ως συνδέτες σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς ώστε να επάγουν δευτερογενή ενδοκυττάρια μονοπάτια σηματοδότησης που οδηγούν στην μεταγραφή ή αποσιώπηση γονιδίων. Η σηματοδότηση διαμεσολαβείται μέσω δύο κατηγοριών υποδοχέων, τους υποδοχείς τύπου II και τους υποδοχείς τύπου I (Tsuchida, et al. 2009), οι οποίοι διαφέρουν μεταξύ τους κυρίως ως προς τη διαμόρφωση του μορίου τους στην περιοχή πρόσδεσης του συνδέτη (Kwiatkowski, et al. 2014) με τους υποδοχείς τύπου I να μην μπορούν να συνδεθούν με τον συνδέτη στην απουσία των τύπου II υποδοχέων (Walton, et al. 2012).

Συνοπτικά, η σηματοδότηση μέσω των ακτιβινών περιλαμβάνει την εξής πορεία: το διμερές μόριο της ακτιβίνης προσδένεται σε ένα διμερές υποδοχέων τύπου II (ACVR2, activin receptor), αλλάζοντας τη διαμόρφωση του συνδέτη (ακτιβίνη) και επιτρέποντάς του να αλληλεπιδράσει με το διμερές υποδοχέων τύπου I (ALK, activin receptor like kinases) (Walton, et al. 2012). Η εξαμερής αυτή διάταξη των μορίων επιτρέπει στη συνέχεια τους υποδοχείς τύπου II να ενεργοποιήσουν μέσω φωσφορυλίωσης το διμερές υποδοχέων τύπου I (Kwiatkowski, et al. 2014). Η ενεργοποίηση των υποδοχέων τύπου I οδηγεί στη φωσφορυλίωση των ενδοκυττάρων μηνυματικών μορίων R SMAD 2 και 3 (receptor regulated SMAD), οι οποίες συμπλέκονται με την co-SMAD 4 (common mediator SMAD και μεταφέρονται στον πυρήνα, όπου με τη βοήθεια μεταγραφικών παραγόντων, συν-ενεργοποιητών (co-activators) και συν-κατασταλτικών παραγόντων (co-repressors), προσδένονται σε SBE (SMAD binding elements) αλληλουχίες του DNA και τροποποιούν τη μεταγραφή γονιδίων (Imamura, et al. 2013). Ανασταλτικό παράγοντα στην πορεία αυτή αποτελεί η I-SMAD 7 (Inhibitory SMAD), η οποία μπορεί να εμποδίσει τη φωσφορυλίωση των R-SMAD 2 και 3 (Santibanez, et al. 2011), τον συσχετισμό της SMAD4 με τις SMAD 2 και 3, όπως και να ανταγωνίζεται για το σημείο πρόσδεσης του υποδοχέα με τις R SMAD καθώς και να προωθεί την αποικοδόμηση των υποδοχέων τύπου I (Gold and Risbridger 2012). Πέραν



του SMAD «κανονικού» μονοπατιού ενδοκυττάριας σηματοδότησης, οι ακτιβίνες μπορούν επίσης να ενεργοποιήσουν και μη-SMAD μονοπάτια όπως των MAPK, (p38 MAPK, JNK, ERK1/2) (Hedger and de Kretser 2013) Akt/PI3K και Wnt/  $\beta$  catenin (Loomans and Andl 2014). **Εικόνα 5** (Hedger and de Kretser 2013).



**Εικόνα 5 :** Παραγωγή, σηματοδότηση και σημεία ρύθμισης της ακτιβίνης Α. Η ακτιβίνη Α δημιουργείται ως ένα ομοδιμερές της  $\beta$ A αλυσίδας, μετά από διμερισμό και πρωτεολυτική (ή υδρολυτική) διάσπαση του προπεπτιδίου της. Η πρόσδεση της ακτιβίνης Α στους υποδοχείς τύπου II (ActR2) προκαλεί την ενεργοποίηση των υποδοχέων τύπου I (ActR1) και την έναρξη ενδοκυττάριας σηματοδότησης είτε μέσω του SMAD μονοπατιού, είτε μέσω των MAPK, που οδηγεί στην επαγωγή πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης ή απόπτωσης. Η ακτιβίνη Β δρα με παρόμοιο τρόπο. Ρύθμιση των λειτουργιών της ακτιβίνης μπορεί να συμβεί μέσω της ταυτόχρονης σύνθεσης της  $\alpha$ 1 υπομονάδας και της  $\beta$ C, οι οποίες δημιουργούν την ινχιμπίνη Α και την ακτιβίνη C και AC, οι οποίες εμποδίζουν την ενεργοποίηση των υποδοχέων. Ρύθμιση της ακτιβίνης Α γίνεται επίσης μέσω των δεσμευτικών πρωτεϊνών φολλιστατίνη και  $\alpha 2$  μακρογκλομπουλίνη, καθώς επίσης και μέσω αρνητικών συν-υποδοχέων όπως οι TGFBR3 (βήτα γλυκάνη) και BAMBI (Hedger and de Kretser 2013).

Καθώς συνολικά στην υπεροικογένεια του TGF $\beta$  υπάρχουν πάνω από 40 γνωστοί συνδέτες και μόνο 5 υποδοχείς τύπου II (TGF $\beta$ R2, BMPR2, AMHR2, ACVR2A, ACVR2B (Loomans and Andl 2014) και 7 υποδοχείς τύπου I (ALK1-7), είναι λογικό να υπάρχει αλληλοεπικάλυψη στη χρήση τους και αλληλεπίδραση (crosstalk) των μονοπατιών (Kwiatkowski, et al. 2014), με το τελικό αποτέλεσμα της σηματοδότησης (μεμβρανικό επίπεδο-υποδοχείς- και ενδοκυττάριο επίπεδο-δευτερογενή μόρια-) να είναι κυτταρο-ειδικό και να προσδιορίζεται από ποικίλους παράγοντες μεταξύ των οποίων η διαφορετική συγγένεια των συνδετών με τους υποδοχείς, η παρουσία ανασταλτικών υποδοχέων και η σχετική συγκέντρωση των διαφορετικών συνδετών (Barakat, et al. 2012).

Οι υποδοχείς τύπου II που χρησιμοποιούνται κυρίως από τις ακτιβίνες είναι οι ACVR2A και ACVR2B, οι οποίοι εμφανίζουν 75% ομοιότητα στην κυτταροπλασματική τους περιοχή και έχουν συνεχή δραστηριότητα κινάσης σερίνης-θρεονίνης καθώς και δύο υποδοχείς τύπου I, οι ALK4 και ALK7, οι οποίοι έχουν 74% ομοιότητα στην κυτταροπλασματική τους περιοχή και απαιτούν φωσφορλίωση σε GS περιοχές τους από τους υποδοχείς τύπου II προκειμένου να

καταστούν ενεργοί (επίσης με δραστηριότητα κινάσης σερίνης- θρεονίνης) Οι υποδοχείς τύπου II και οι υποδοχείς τύπου I δεν παρουσιάζουν σχεδόν καμία ομοιότητα στην εξωκυτταρική περιοχή τους (ECD) (Walton, et al. 2012), ενώ η GS περιοχή των τύπου I υποδοχέων καθορίζει την διαφορετική ενεργοποίηση των δευτερογενών μορίων ενδοκυττάριας σηματοδότησης, με τους ALK 4,5,7 (συνδέτες TGFβ, Nodal, ακτιβίνες) να ενεργοποιούν μέσω φωσφορυλίωσης τις R SMAD 2 και 3, και τους ALK 2,3,6 (συνδέτες BMP, GDF, AMH) να ενεργοποιούν τις R SMAD 1,5 και 8. (McDowall, et al. 2008; Tsuchida, et al. 2009).

Οι ακτιβίνες έχουν διαφορετική συγγένεια πρόσδεσης για τους υποδοχείς τους, με την ακτιβίνη A να έχει τη μεγαλύτερη για τον υποδοχέα ACVR2B και μικρότερη (3-4 φορές) για τον ACVR2A (Walton, et al. 2012), καθώς επίσης μεγαλύτερη για τον ALK4 σε σχέση με τον ALK 7 (Tsuchida, et al. 2009). Τα δεδομένα για την ακτιβίνη B συμφωνούν ως προς τη χαμηλότερη συγγένεια της ακτιβίνης B για τον υποδοχέα ACVR 2A σε σχέση με την ακτιβίνη A καθώς και για την υψηλότερη συγγένεια σύνδεσης για τον ALK 7 σε σχέση με τον ALK 4, διαφωνούν όμως ως προς τη συγγένεια σύνδεσης με τον υποδοχέα ACVR 2B. Οι Walton, et al.(2012) και Hedger, et.al.(2013), αναφέρουν ότι η ακτιβίνη B έχει χαμηλότερη συγγένεια για τον υποδοχέα αυτόν σε σχέση με την ακτιβίνη A (λόγω της διαφορετικής αλληλουχίας αμινοξέων της ακτιβίνης B στην προβλεπόμενη περιοχή πρόσδεσης με τον υποδοχέα), ενώ οι Thompson, et.al.(2004) αναφέρουν ότι η ακτιβίνη B ενδέχεται να έχει μεγαλύτερη συγγένεια για τον ACVR 2B με βάση την υψηλότερη συγγένεια πρόσδεσης που εμφανίζει η ινχιμπίνη B (α-Bβ) (λόγω της ομοιότητας των ββ αλυσίδων στην ακτιβίνη B και ινχιμπίνη B) (Hedger and de Kretser 2013; Thompson, et al. 2004; Walton, et al. 2012).

Παρόλο που η ακτιβίνη B θεωρείται ένας αδύναμος αγωνιστής σηματοδότησης σε σχέση με την ακτιβίνη A (Hedger and de Kretser 2013), *in vitro* δεδομένα έχουν δείξει παρόμοια ή και μεγαλύτερη βιοδραστικότητα της ακτιβίνης B σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές (Makanji, et al. 2014), υποδηλώνοντας ότι η ακτιβίνη B μπορεί να παρουσιάζει διαφορετικό εύρος λειτουργιών λόγω της ικανότητάς της να δένει και στους δύο τύπους υποδοχέων I (ALK 4 και ALK 7), ενώ το τελικό αποτέλεσμα της σηματοδότησης μπορεί να επηρεάζεται από τη σχετική συγγένεια πρόσδεσης των ακτιβινών για τους υποδοχείς τους, από την παρουσία ανταγωνιστών καθώς και από τη διαφορετική χρονική έκφραση των παραπάνω παραγόντων (ακτιβίνες, υποδοχείς, ανταγωνιστές) (Hedger and de Kretser 2013; Makanji, et al. 2014).

Οι ακτιβίνες επίσης έχουν αναφερθεί να σηματοδοτούν και μέσω του BMPR2 σε γοναδοτρόπα κύτταρα ποντικού LβT2 (Fortin, et al. 2015), ενώ η ακτιβίνη B έχει αναφερθεί να σηματοδοτεί και μέσω του ALK 3 σε ηπατοκύτταρα ποντικού και σε ανθρώπινα ηπατοκαρκινικά κύτταρα (Tamminen, et al. 2015). Οι ακτιβίνες μοιράζονται τόσο τους τύπου II όσο και τους τύπους I υποδοχείς τους και με άλλα μέλη τις TGFβ υπεροικογένειας μεταξύ των οποίων τα κυριότερα αναφέρονται στην **Εικόνα 6** (Tsuchida, et al. 2009).

Συνδέτες	Υποδοχείς τύπου II	Υποδοχείς τύπου I		Smad
Ακτιβίνη A	ActRIIA, IIB	ALK4, (7)	-	Smad 2,3
Ακτιβίνη B	ActRIIA, IIB	ALK7, (4)	-	
Ακτιβίνη AB	ActRIIA, IIB	ALK4, 7	-	Smad4
Ινχιμπίνη A, B	ActRIIA, IIB	-	Betaglycan	
Myostatin GDF11	ActRIIB, (IIA)	ALK5, (4)	-	Smad 2,3
	ActRIIB, IIA	ALK4, 5	-	Smad4
Nodal	ActRIIB, IIA	ALK4, 7	Cripto	Smad 2,3
				Smad4

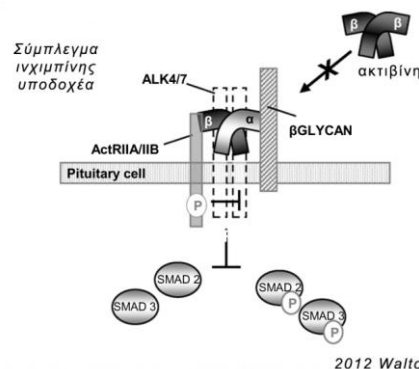
Σημείωση: ασθενέστερη αλληλεπίδραση με τους υποδοχείς σε παρένθεση

2009 Tsuchida

**Εικόνα 6:** Συνδυασμοί υποδοχέων και συνδετών για τις ακτιβίνες και άλλα μέλη της υπεροικογένειας του TGFβ (Tsuchida, et al. 2009).

Η μυοστατίνη ( GDF8) είναι μία πρωτεΐνη που ρυθμίζει αρνητικά την μάζα των σκελετικών μυών, ο GDF 11 εμπλέκεται στη νευρογένεση και στην ανάπτυξη των νεφρών και της ενδοκρινούς μοίρας του παγκρέατος, ενώ η πρωτεΐνη Nodal αποτελεί σημαντικό παράγοντα επαγωγής του μεσοδέρματος κατά την εμβρυογένεση. Άλλοι παράγοντες, που έχουν αναφερθεί να χρησιμοποιούν τους υποδοχείς των ακτιβινών, είναι επίσης οι GDF 3 (ALK7) (Tsuchida, et al. 2009), οι GDF 1,3,8 (ALK4) (Kelber, et al. 2008) καθώς και οι BMP 2,4,7(ACVR 2A και ACVR 2B) (Santibanez, et al. 2011). Μοντέλα ζώων με έλλειψη (KO) των υποδοχέων των ακτιβινών τύπου II και τύπου I, μαρτυρούν τη σημαντική δράση της σηματοδότησής τους κατά την εμβρυογένεση και αναδεικνύουν τον σημαντικό ρόλο του υποδοχέα ACVR 2A στη γονιμότητα και των δύο φύλων (παρουσίαση φαινοτύπων (Makanji, et al. 2014).

Οι ινχιμπίνες έχουν χαμηλή συγγένεια πρόσδεσης για τους τύπου II υποδοχείς των ακτιβινών (ACVR 2A και ACVR B), ωστόσο η ικανότητα πρόσδεσής τους αυξάνεται στην παρουσία της βήτα γλυκάνης (betaglycan). Η βήτα γλυκάνη, ή αλλιώς TGFBR3, είναι μία μεμβρανο-συνδεδεμένη πρωτεογλυκάνη της πλασματικής μεμβράνης, η οποία στερείται της ενδοκυττάριας σηματοδοτούσας περιοχής (Stenvers and Findlay 2010). Οι ινχιμπίνες προσδένουν σε αυτήν μέσω της άλφα υπομονάδας τους και η σύνδεση αυτή τους επιτρέπει να αλληλεπιδράσουν, μέσω της βήτα υπομονάδας τους, με τους υποδοχείς τύπου II (Makanji, et al. 2014; Walton, et al. 2012). Η πρόσδεση αυτή δρα ανασταλτικά στη σηματοδότηση των τύπου II υποδοχέων για τις ακτιβίνες A και B, όπως και για άλλα μέλη της υπερικογενείας του TGFβ ( TGFβ2, BMP 2,4,6,7,8, GDF 9,11) (Robertson 2012) καθώς δεν επιτρέπει την αλληλεπίδραση των υποδοχέων τύπου II με τους υποδοχείς τύπου I. **Εικόνα 7** (Walton, et al. 2012). Η δράση των ινχιμπινών επομένως κατά κύριο λόγο δεν είναι η δημιουργία σηματοδότησης αλλά η κατάληψη των υποδοχέων ώστε να μην μπορούν να χρησιμοποιηθούν σηματοδοτικά από άλλους συνδέτες.



2012 Walton

**Εικόνα 7** :Μοντέλο του συμπλέγματος ινχιμπίνη-υποδοχείς. Η ινχιμπίνη δένει μέσω της α υπομονάδας της με τη βήτα γλυκάνη και μέσω της βήτα υπομονάδας της με τον υποδοχέα τύπου II (ActRIIA/IIIB). Η αλληλεπίδραση αυτή απομακρύνει τους υποδοχείς τύπου II, εμποδίζοντας την ενεργοποίηση των τύπου I (ALK4/7) υποδοχέων, με αποτέλεσμα την εμποδισή της ενεργοποίησης του SMAD μονοπατιού. (Walton, et al. 2012).

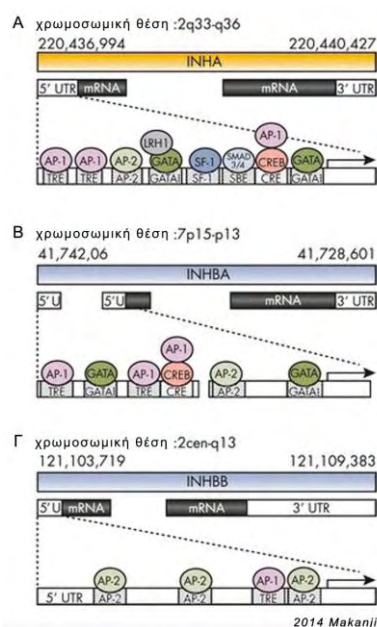
Οι διάφορες μορφές των ινχιμπινών παρουσιάζουν διαφορετική ικανότητα σύνδεσης με τη βήτα γλυκάνη, με την ινχιμπίνη B και τις δι-γλυκοζυλιωμένες μορφές (34kDa) να έχουν χαμηλότερη ικανότητα πρόσδεσης (Stenvers and Findlay 2010). Παρόλα αυτά, η ινχιμπίνη B (31kDa) βρέθηκε να έχει μεγαλύτερη βιοδραστικότητα σε σχέση με την ινχιμπίνη A (μείωση FSH) τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Τα δεδομένα αυτά αναδεικνύουν ότι αυτή κάθε αυτή η ικανότητα πρόσδεσης των διαφόρων συνδετών για τους υποδοχείς τους δεν είναι ο μοναδικός παράγοντας για την αξιολόγηση της δράσης τους στα μελετώμενα συστήματα. Άλλοι παράγοντες, όπως η παρουσία ενδεχομένως διαφορετικών συν-υποδοχέων και η διαφορετική σχετική συγκέντρωση των συνδετών στην πλασματική μεμβράνη, μπορεί να επηρεάζουν το τελικό αποτέλεσμα της σηματοδότησης (Walton, et al. 2012).

Ο σημαντικός ρόλος της σηματοδότησης μέσω των υποδοχέων των ακτιβινών όπως και η εμπόδιση τους από τις ινχιμπίνες, αναδεικνύεται επίσης και από τις περιπτώσεις μεταλλαγμένων ή πολυμορφικών υποδοχέων, οι οποίοι οδηγούν στην εμφάνιση παθολογίας. Μεταλλαγές έχουν αναφερθεί στον καρκίνο του παγκρέατος (ALK4) και πολυμορφισμοί στα αδενώματα της υπόφυσης (ACVR 2A) (Santibanez, et al. 2011) καθώς και στην προεκλαμψία (ACVR 2A) (Thulluru, et al. 2015; Williamson, et al. 2015). Επιπλέον αλλαγή στην έκφραση (μείωση mRNA) ανασταλτικών υποδοχέων (βήτα γλυκάνη) έχει συνδεθεί με την ανάπτυξη και μεταστατική ικανότητα καρκίνων του αναπαραγωγικού συστήματος (ωοθηκών, ενδομητρίου, μαστού και προστάτη)(Stenvers and Findlay 2010).

## Ρύθμιση

Η ρύθμιση της οικογένειας των ακτιβινών και ινχιμπινών γίνεται σε πολλά επίπεδα, όπως θα ανάμενε κάποιος για πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε τόσες πολλές και διαφορετικές διαδικασίες, ενώ το αποτέλεσμα της ρύθμισης εξαρτάται από την αλληλεπίδραση πλειάδας παραγόντων που μεταβάλλονται ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο.

Σε επίπεδο γονιδίου, ο υποκινητής της άλφα υπομονάδας των ινχιμπινών περιλαμβάνει αλληλουχίες πρόσδεσης TRE, CRE, GATA, SF1 και SBE, ενώ ο υποκινητής της βήτα A υπομονάδας περιλαμβάνει το κλασικό κουτί TATA, τις αλληλουχίες πρόσδεσης TRE, CRE, GATA (Makanji, et al. 2014), καθώς και αλληλουχίες πρόσδεσης AP1 και AP2 (Hedger and de Kretser 2013). Ο υποκινητής του γονιδίου της βήτα B υπομονάδας, εμφανίζει πολλαπλές περιοχές πρόσδεσης AP1 και AP2, υποδηλώνοντας ότι μπορεί να ρυθμίζεται όπως και η βήτα A υπομονάδα (Hedger and de Kretser 2013), καθώς και 3 αλληλουχίες πρόσδεσης CRE, αλλά στερείται του κλασικού κουτιού πρόσδεσης της RNA πολυμεράσης TATA, επιτρέποντας τη μεταγραφή του να διαμεσολαβείται πιθανώς μέσω των SP1 και AP2 περιοχών (Makanji, et al. 2014). **Εικόνα 8** (Makanji, et al. 2014).

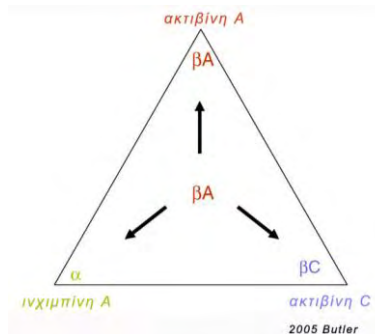


**Εικόνα 8 :** Σχηματική αναπαράσταση των γονιδίων της άλφα υπομονάδας ινχιμπίνης (Α), της βΑ υπομονάδας (Β) και της βΒ υπομονάδας (Γ). Στη δεύτερη γραμμή σημειώνεται το mRNA κάθε υπομονάδας, καθώς και οι σημαντικές ρυθμιστικές περιοχές μέσα στην 5' αμετάφραστη περιοχή(UTR): GATA, SBE, CREs, TREs. Σημειώνονται επίσης μεταγραφικοί παράγοντες ενεργοποίησης που δρουν στις περιοχές αυτές :CREB, SF-1, LRH-1, AP-1, AP-2. (Makanji, et al. 2014).

Οι πλέον γνωστοί παράγοντες που επάγουν τη μεταγραφή τόσο των ινχιμπινών όσο και των ακτιβινών είναι οι γοναδοτροπίνες FSH και LH, οι οποίες δένοντας σε GCPRs (G-coupled protein receptors) της πλασματικής μεμβράνης οδηγούν σε αύξηση του κυκλικού AMP, ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A και συνεπαγόμενη ενεργοποίηση του CREB, ο οποίος δίνει στις αλληλουχίες πρόσδεσης CRE και επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων (Makanji, et al. 2014). Άλλοι παράγοντες που έχουν αναφερθεί να επάγουν την έκφραση της ακτιβίνης A *in vitro* αποτελούν οι IL1 $\beta$  (interleukin 1b), TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha) (Keelan, et al. 1998), EGF (epidermal growth factor) (Bearfield, et al. 2005), IL13, αγγιοτενσίνη, ενδοθελίνη, προγεστερόνη (Hedger and de Kretser 2013), hCG (human chorionic gonadotropin) (Muttukrishna, et al. 2004b), καθώς και το οξειδωτικό στρες (Mandang, et al. 2007), ενώ η προλακτίνη, τα πλακουντιακά γαλακτογόνα (Tessier, et al. 2003) και τα γλυκοκορτικοειδή (de Kretser, et al. 2012) έχουν αναφερθεί να την αναστέλλουν. Τα δεδομένα για την ακτιβίνη B είναι περιορισμένα και πέραν των FSH και LH (Makanji, et al. 2014), η φλεγμονή (Hedger and de Kretser 2013; Phillips, et al. 2009) και η ακτιβίνη A (Antenos, et al. 2008) έχουν αναφερθεί να επάγουν την έκφρασή της.

Στο επίπεδο της σύνθεσης, οι ινχιμπίνες μπορεί να ανταγωνίζονται με τις ακτιβίνες ως προς τις βήτα υπομονάδες για το σχηματισμό των διμερών τους (Hedger and de Kretser 2013; Trombly, et al. 2009). Η γλυκοζυλίωση της άλφα υπομονάδας των ινχιμπινών, όπως έχει ήδη αναφερθεί, επηρεάζει τον σχηματισμό των διμερών ινχιμπίνης (Stenvers and Findlay 2010) και τα πειράματα των Antenos, et al. (2007) δείχνουν ότι διαφορετική γλυκοζυλίωση της άλφα υπομονάδας μπορεί να επηρεάσει το ισοζύγιο δημιουργίας ινχιμπινών ή ακτιβινών, με την έλλειψη γλυκοζυλίωσης να εμποδίζει τον σχηματισμό ινχιμπινών, την πλήρη γλυκοζυλίωση να ευνοεί τον σχηματισμό ινχιμπινών και τον μικρότερο βαθμό γλυκοζυλίωσης να επιτρέπει τον σχηματισμό ακτιβίνης A (Antenos, et al. 2007).

Επίσης η βήτα C υπομονάδα των ακτιβινών έχει τη δυνατότητα να αναστέλλει τη δράση της ακτιβίνης A μειώνοντας τα επίπεδα της προσβάσιμης βA υπομονάδας, μέσω του σχηματισμού ετεροδιμερών βA-βC, μία ιδιότητα που οδηγεί σε μείωση της σηματοδότησης της ακτιβίνης A τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (Gold and Risbridger 2012). Με αυτόν τον τρόπο η σχετική συγκέντρωση των διαφόρων υπομονάδων μπορεί να επηρεάζει τον τελικό σχηματισμό των διμερών ακτιβίνης, **εικόνα 9** (Butler, et al. 2005). Παρόμοια δράση ενδέχεται να έχει η βC υπομονάδα και με το σχηματισμό των βB-βC διμερών που έχουν αναφερθεί, ως προς τη σηματοδότηση της ακτιβίνης B (Butler, et al. 2005). Οι Keah, et al. (2005) έχουν προτείνει ότι και η βB υπομονάδα της ακτιβίνης B ενδέχεται να έχει παρόμοιο ρόλο με την ακτιβίνη C στη ρύθμιση της ακτιβίνης A, ανταγωνιζόμενη με την βA για τη δημιουργία της ακτιβίνης AB, μεταβάλλοντας έτσι την σχετική συγκέντρωση της διαθέσιμης ακτιβίνης A (Keah and Hearn 2005).



**Εικόνα 9 :** Σχηματική απεικόνιση της σχέσης μεταξύ των βA, βC και άλφα υπομονάδων. Η δημιουργία διμερών είναι δυνατή με όλες τις υπομονάδες και το αποτέλεσμα εξαρτάται από τη σχετική παρουσία κάθε μονομερούς μέσα στο κύτταρο. Η παρουσία ενός διμερούς ινχιμπίνης C (α-βC) δεν έχει αποδειχτεί μέχρι στιγμής. (Butler, et al. 2005).

Στο σχηματισμό των ώριμων διμερών των ακτιβινών σημαντικό και απαραίτητο για τη βιοδραστικότητά τους ρόλο έχει και η διαδικασία της πέψης των πρόδρομων υπομονάδων (Makanji, et al. 2014), όπως έχει ήδη αναφερθεί. Στη διαδικασία αυτή συμμετέχουν ένζυμα της οικογένειας των προκονβερτασών των προ-πρωτεϊνών, μεταξύ των οποίων η φουρίνη (furin) (PCSK3, proprotein convertase subtilisin kexin) και η PCSK5. Και οι δύο αυτές πρωτεΐνες μπορούν να πέψουν την άλφα και τη βήτα Β (βΒ) υπομονάδα, μεταβάλλοντας το ισοζύγιο των ώριμων ακτιβινών και ινχιμπινών που δημιουργούνται. Οι Antenos, et al. (2008) έδειξαν ότι η ακτιβίνη Α μπορεί επάγει την έκφραση της άλφα υπομονάδας, της βΒ (3 φορές περισσότερο) και της φουρίνης σε LβT2 γοναδοτρόπα κύτταρα, δημιουργώντας η ίδια τις προϋποθέσεις για τη μεταβολή του ισοζυγίου των ακτιβινών/ινχιμπινών προς τον σχηματισμό ακτιβίνης Β (Antenos, et al. 2008). Παρόμοια δράση έχει αναφερθεί επίσης και σε κυτταρικές σειρές ωθήκης ποντικών, όπου η ακτιβίνη Α βρέθηκε να επάγει την PCSK 5 αλλά όχι την φουρίνη, σε συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο των ωοθυλακίων κατά τη μετάβασή τους από το δίστοιβο επιθήλιο κοκκωδών σε προκοιλιακά ωοθυλάκια (Antenos, et al. 2011). Τα παραπάνω δεδομένα μαρτυρούν ότι η ίδια η ακτιβίνη Α μπορεί να συμμετέχει στη ρύθμιση του ισοζυγίου των ώριμων ακτιβινών και ινχιμπινών που δημιουργούνται, με τρόπο κύτταρο και χρόνο-ειδικό.

Στο εξωκυττάριο επίπεδο μόρια προσδέτες ( binding proteins) μπορεί να δρουν είτε ως οχήματα μεταφοράς των ακτιβινών, είτε ως ανταγωνιστές της δράσης τους εμποδίζοντας την πρόσδεσή τους με τους υποδοχείς τους, είτε ως ένα σύστημα απομάκρυνσης των ακτιβινών από την κυκλοφορία μέσω ενδοκυττάρωσης και αποικοδόμησης. Στην κατηγορία αυτή πρωτεϊνών ανήκουν η φολλιστατίνη, η FSTL3 και η α2 μακρογκλομπουλίνη (α2 macroglobulin) (Hedger and de Kretser 2013; Makanji, et al. 2014). Ταυτόχρονα στο ίδιο επίπεδο μπορούν να δρουν και διαλυτές μορφές υποδοχέων ικανοί να προσδένουν τον συνδέτη τους, όπως η διαλυτή μορφή της βήτα γλυκάνης (Santibanez, et al. 2011; Walton, et al. 2012) και του ALK7 (Jones, et al. 2006c).

Η φολλιστατίνη (follistatin), είναι μία γλυκοζυλιωμένη μονομερής πρωτεΐνη, η οποία μπορεί να δέσει την ακτιβίνη σε ένα σύμπλεγμα δύο μορίων φολλιστατίνης και μίας διμερούς ακτιβίνης, με αποτέλεσμα είτε να εμποδίζει την πρόσδεση της ακτιβίνης στους υποδοχείς της (Gold and Risbridger 2012; Walton, et al. 2012), είτε να την οδηγεί μετά από πρόσδεση με HSPG , σε λυσοσωμική αποικοδόμηση μειώνοντας έτσι τη συγκέντρωσή της (Hedger and de Kretser 2013; Walton, et al. 2012). Το γονίδιο της φολλιστατίνης εδρασμένο στο χρωμόσωμα 5, δίνει γένεση μετά από εναλλακτικό μάπισμα του mRNA σε δύο πεπτίδια διαφορετικού μήκους, με 288 αμινοξέα (FS 288) και 315 αμινοξέα (FS 315), ενώ μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως η περαιτέρω πέψη (FS 303) και η γλυκοζυλίωση δημιουργούν μία ποικιλία μορφών πεπτιδίων φολλιστατίνης, καθιστώντας τον προσδιορισμό της έκφρασής τους ιδιαίτερα δύσκολο (Phillips and de Kretser 1998). Οι δύο βασικές μορφές της φολλιστατίνης (FS 288 και FS 315), θεωρείται ότι έχουν διαφορετικούς ρόλους, με την FS 288 να λειτουργεί κυρίως στο επίπεδο των ιστών λόγω της ικανότητας του μορίου της να προσδένει σε HSPG της πλασματικής μεμβράνης, ενώ η FS 315 θεωρείται ότι βρίσκεται κυρίως στην κυκλοφορία λόγω της ανικανότητας να προσδέσει σε HSPG (Makanji, et al. 2014). Άλλα δεδομένα ωστόσο προτείνουν ότι και η FS 318 μπορεί να δέσει με HSPG, αφού το καρβοξυτελικό της άκρο (που εμποδίζει την πρόσδεση) ενδέχεται να αλλάξει διάταξη μετά την πρόσδεση της ακτιβίνης (Hedger and de Kretser 2013).

Οι φολλιστατίνες εκφράζονται σε μία ποικιλία ιστών, όπως στην υπόφυση, τις γονάδες, το ενδομήτριο, τον πλακούντα, τα οστά, το δέρμα, το πάγκρεας και τους σκελετικούς μύες (Hedger and de Kretser 2013; Phillips and de Kretser 1998; Walton, et al. 2012) , και μπορούν να προσδέσουν στην ακτιβίνη Α , σχεδόν μη-αντιστρεπτά, με υψηλή συγγένεια, ενώ παρουσιάζουν 10 φορές λιγότερη συγγένεια πρόσδεσης για την ακτιβίνη Β (Makanji, et al.



2014). Η ικανότητα πρόσδεσης των φολλιστατινών για την ακτιβίνη A είναι παρόμοια με την ισχύ πρόσδεσης της ακτιβίνης A για τους υποδοχείς της, γεγονός που καθιστά τις φολλιστατίνες ισχυρά μόρια απόσβεσης της δράσης της (Phillips and de Kretser 1998). Η FS 318, η οποία θεωρείται η κύρια μορφή φολλιστατίνης στην κυκλοφορία, έχει πηγή προέλευσης κυρίως μη-γοναδική (Makanji, et al. 2014), καθώς ζώα με γοναδεκτομή παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα FS 318 (Phillips and de Kretser 1998), ενώ η FS 303 μορφή έχει βρεθεί μόνο στο ωοθυλακικό υγρό και παρουσιάζει μικρότερη ικανότητα πρόσδεσης με την ακτιβίνη σε σχέση με τις FS 288 και FS 318 (Makanji, et al. 2014).

Οι φολλιστατίνες μπορούν επίσης να προσδέσουν και άλλους συνδέτες μέλη της υπερικογενείας του TGFβ, όπως τους GDF 8,9,11, τις BMP 2,4,6,7,11 (Barakat, et al. 2012; Hedger and de Kretser 2013; Makanji, et al. 2014) καθώς επίσης και τις ινχιμπίνες και την α2 μακρογκλομπουλίνη (Phillips and de Kretser 1998), αλλά με μικρότερη συγγένεια σε σχέση με τις ακτιβίνες. Παράγοντες που έχουν αναφερθεί να επάγουν την έκφραση των φολλιστατινών αποτελούν η ακτιβίνη A, ακτιβίνη B, η GnRH και η FSH στην υπόφυση (Linko, et al. 2014; Makanji, et al. 2014; Medan, et al. 2007), καθώς και το χειρουργικό τραύμα και η φλεγμονή (Phillips and de Kretser 1998). Μελέτες σε μοντέλα ζώων με έλλειψη (KO) της φολλιστατίνης αναδεικνύουν τον σημαντικό ρόλο της κατά την ανάπτυξη (Phillips and de Kretser 1998), (Makanji, et al. 2014), ενώ διαγονιδιακά ζώα με υπερέκφραση των επιμέρους φολλιστατινών (FS 288, FS 313) φανερώνουν την εμπλοκή τους στη σωστή ανάπτυξη και λειτουργία ιδίως του θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος (παρουσίαση φαινοτύπων (Makanji, et al. 2014).

Η FSTL 3 (follistatin like-3) (ή FLRG follistatin related gene, ή FSRP follistatin related protein) είναι μία πρωτεΐνη που σχετίζεται δομικά με την φολλιστατίνη (λόγω της ύπαρξης της συντηρημένης ακολουθίας FD, follistatin domain) και μπορεί να δέσει με υψηλή συγγένεια με την ακτιβίνη A, παρουσιάζει όμως απουσία πρόσδεσης με τις HSPG (Hedger and de Kretser 2013; Makanji, et al. 2014) και γι αυτό τον λόγο θεωρείται ότι δεν επηρεάζει σημαντικά την εξωκυττάρια συγκέντρωση της ακτιβίνης (Hedger and de Kretser 2013). Όπως και η φολλιστατίνη, η FSTL 3 δένει με μικρότερη ικανότητα (10 φορές λιγότερο) την ακτιβίνη B (Makanji, et al. 2014; Walton, et al. 2012) και ο τρόπος πρόσδεσής της περιλαμβάνει δύο μόρια της FSTL 3 να δένουν σε ένα διμερές ακτιβίνης (Walton, et al. 2012). Η FSTL 3 μπορεί να δέσει επίσης τις BMP 2,4,15 και τον GDF 8, και έχει βρεθεί με υψηλή έκφραση στον πλακούντα, τα επινεφρίδια, το ενδομήτριο και τους όρχεις (Makanji, et al. 2014; Walton, et al. 2012). Ζώα με έλλειψη (KO) της FSTL 3 παρουσιάζουν απορύθμιση στον μεταβολισμό γλυκόζης και την ομοιόσταση λιπών, εμπλέκοντας τις ακτιβίνες και τη μυοστατίνη στη λειτουργία και ανάπτυξη του παγκρέατος (Makanji, et al. 2014; Tsuchida, et al. 2009), ενώ διαγονιδιακά ζώα με υπερέκφραση της FSTL 3 αναδεικνύουν τον ρόλο της πρωτεΐνης αυτής στη φυσιολογική ανάπτυξη και λειτουργία των γονάδων και τη γονιμότητα (παρουσίαση φαινοτύπων (Makanji, et al. 2014).

Η α2 μακρογκλομπουλίνη (α2M) είναι μία ομοτετραμερής γλυκοπρωτεΐνη υψηλού μοριακού βάρους του πλάσματος, η οποία αποτελεί μέρος των μηχανισμών έμφυτης ανοσίας (Rehman, et al. 2013), παράγεται από πολλούς κυτταρικούς τύπους όπως οι πνευμονικοί ινοβλάστες, τα μονοκύτταρα τα μακροφάγα, τα ηπατοκύτταρα, τα αστροκύτταρα (Chen, et al. 2014b) και λειτουργεί κυρίως ως μία παγίδα των πρωτεϊνών. Η πρωτεΐνη αυτή συναντάται με δύο μορφές, μία «αργή» και μία «γρήγορη» ή μετασχηματισμένη, με την πρώτη να λειτουργεί κυρίως ως όχημα μεταφοράς και τη δεύτερη να συνδέεται με τον υποδοχέα της α2 μακρογκλομπουλίνης και να οδηγεί στην ενδοκυττάρωση και αποικοδόμηση των μορίων που έχει προσδέσει (Rehman, et al. 2013).

Η α2 μακρογκλομπουλίνη μπορεί επίσης να προσδέσει πέραν των πρωτεϊνών και έναν μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών (defensins, μυελίνη, φολλιστατίνη), κυτοκινών (FGF, PDGF, IL1β,

IL6, TNFα) ορμονών (hepcidin, λεπτίνη) καθώς και μελών της TGFβ υπερικογένειας (Rehman, et al. 2013). Οι ακτιβίνες μπορούν να δεθούν τόσο με την αργή όσο και τη γρήγορη μορφή της α2 μακρογλομπουλίνης, ενώ οι ινχιμπίνες και η φολλιστατίνη δένουν κυρίως με την γρήγορη μορφή, οδηγώντας τις στην αποικοδόμηση (Makanji, et al. 2014; Rehman, et al. 2013). Η α2 μακρογλομπουλίνη επάγεται από παράγοντες όπως ο TGFβ και η IL6 και η συγκέντρωσή της αυξάνεται αισθητά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, εμβρυογένεσης και παιδικής ηλικίας αναδεικνύοντας τον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει κατά τις περιόδους ανάπτυξης και διαφοροποίησης (Chen, et al. 2014a).

Στο επίπεδο της πλασματικής μεμβράνης, μεμβrano-συνδεδεμένες πρωτεΐνες χωρίς δραστηριότητα κινάσης σερίνης θρεονίνης, όπως η βήτα γλυκάνη που έχει ήδη αναφερθεί μπορούν να επηρεάσουν την πορεία της σηματοδότησης των ακτιβινών. Μέλος των υποδοχέων τύπου III (TGFB3) αποτελεί μαζί με την βήτα γλυκάνη και η ενδογλίνη (endoglin), η οποία στερείται επίσης τη δραστηριότητα κινάσης στο ενδοκυττάριο τμήμα της και μπορεί να δέσει με συνδέτες όπως ο TGFβ1, οι BMP 2,7 και η ακτιβίνη A. Η ενδογλίνη εκφράζεται κυρίως σε αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και μπορεί να ενισχύσει την ενεργοποίηση των SMAD 1,5 και να εμποδίσει την SMAD 3 (Santibanez, et al. 2011), εμποδίζοντας επομένως και τη σηματοδότηση της ακτιβίνης A.

Παρομοίως ο συν-υποδοχέας Cripto που απαιτείται για τη σηματοδότηση του συνδέτη Nodal, παρεμποδίζει τη σύνδεση της ακτιβίνης με τους υποδοχείς τύπου II και την επακόλουθη ενεργοποίηση των τύπου I υποδοχέων (Gold and Risbridger 2012). Ο Cripto έχει επίσης αναφερθεί να προσδένει και την ακτιβίνη B και να εμποδίζει τη σηματοδότησή της, ενδεχομένως δημιουργώντας ανενεργά σύμπλοκα με την ακτιβίνη B είτε με τον υποδοχέα της ALK4 (Kelber, et al. 2008).

Μία ακόμα μεμβrano-συνδεδεμένη πρωτεΐνη, η BAMBI (bone morphogenetic and activin membrane bound inhibitor), λειτουργεί ως ένας ψευδο-υποδοχέας (Zhao and Chen 2014), χωρίς δραστηριότητας κινάσης και προσδένει τους συνδέτες ακτιβίνη, BMP και TGFβ εμποδίζοντας τη σηματοδότησή τους (Barakat, et al. 2012). Η BAMBI έχει επίσης αναφερθεί να μπορεί να συσχετίζεται και να δημιουργεί σταθερά σύμπλοκα τόσο με τους υποδοχείς τύπου II όσο και τύπου I, στην απουσία συνδέτη (Gold and Risbridger 2012) καθώς και να συνεργάζεται με την ανασταλτική I-SMAD 7, εμποδίζοντας την ενεργοποίηση της SMAD 3 (Zhao and Chen 2014). Παρόλο που οι πρωτεΐνες αυτές λειτουργούν κυρίως ως «παγίδες» για τους συνδέτες εμποδίζοντας τη δράση τους, οι Knight, et al. (2006) έχουν προτείνει ότι ενδέχεται, στην περίπτωση της BAMBI για παράδειγμα, να αυξάνουν την τοπική συγκέντρωση των συνδετών κοντά στην πλασματική μεμβράνη και να αυξάνουν έτσι την πιθανότητα να αλληλεπιδράσουν οι συνδέτες με τους υποδοχείς τους (Knight and Glistler 2006).

Την διαθεσιμότητα και την σταθερότητα των ίδιων των υποδοχέων των ακτιβινών επηρεάζουν επίσης οι διαδικασίες της φωσφορυλίωσης, της ουβικουϊνίνωσης και συμωλίωσης (Santibanez, et al. 2011), καθώς και ο ρυθμός της ενδοκυττάρωσής τους μέσω λιπιδιακών σχεδίων (lipid rafts), με την παρουσία κλαθρίνης (clathrin) στις λιπιδιακές σχεδίες να σχετίζεται θετικά με τη σηματοδότηση και ανακύκλωση των υποδοχέων, ενώ η παρουσία της καβεολίνης (caveolin) να οδηγεί στην αποικοδόμησή τους (Santibanez, et al. 2011; Zhao and Chen 2014). Μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις μπορεί επίσης να επηρεάζουν τη διαθεσιμότητά τους, όπως στην περίπτωση του ALK4, ο οποίος ρυθμίζεται αρνητικά από το miR-24 (Zhao and Chen 2014) και το miR-145 (Yan, et al. 2012) και του υποδοχέα ALK7 από το miR376c (Fu, et al. 2013).

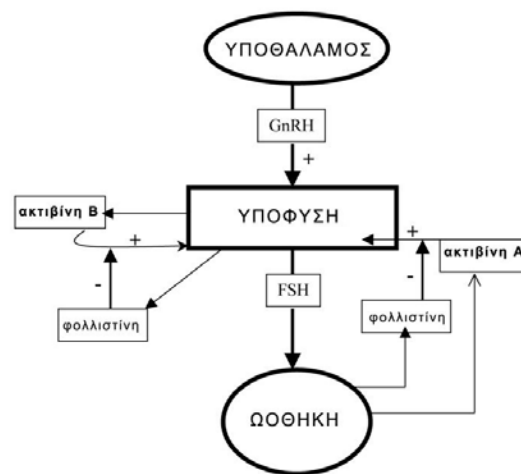


Στο ενδοκυττάριο επίπεδο, στην περίπτωση του SMAD μονοπατιού, το τελικό αποτέλεσμα εξαρτάται από τις R SMAD 1,5,8 που ενεργοποιούνται από τους συνδέτες BMP, GDF, AMH και αναστέλλονται από την I SMAD 6, καθώς και από τις R SMAD 2,3 που ενεργοποιούνται από τους συνδέτες TGF, Nodal, ακτιβίνες και αναστέλλονται από την I SMAD 7, όπως έχει ήδη αναφερθεί καθώς και από τις πρωτεΐνες Smurf (SMAD ubiquitin regulatory factor) που ρυθμίζουν την αποικοδόμηση των SMAD όπως και την αποικοδόμηση των υποδοχέων (Tsuchida, et al. 2009). Επιπλέον, η πρωτεΐνη SARA (SMAD anchor for receptor activation) αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς τύπου I και επηρεάζει τη σηματοδότησή τους (Tsuchida, et al. 2009), αφού είναι απαραίτητη για την πλήρη ενεργοποίηση της SMAD 2 (Barakat, et al. 2012), ενώ οι πρωτεΐνες ARIPs (activin receptor interacting proteins) συσχετίζονται με τους υποδοχείς τύπου II επηρεάζοντας την αγκίστρωσή τους στην πλασματική μεμβράνη, καθώς και τη σηματοδότησή τους είτε θετικά είτε αρνητικά, ανάλογα με την ισομορφή τους (Tsuchida, et al. 2009).

## Μέρος Β

### Ρόλοι ακτιβινών στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας των ακτιβινών, ακτιβίνες και ινχιμπίνες, μαζί με τη δεσμευτική των ακτιβινών πρωτεΐνη φολλιστατίνη έχουν ευρεία έκφραση στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα σε ιστούς όπως η υπόφυση, οι ωοθήκες, η μήτρα, οι μαστοί, και ο πλακούντας, επηρεάζοντας τη λειτουργία τους. (Gold and Risbridger 2012; Mankanji, et al. 2014). Στο σύστημα του άξονα ΥΥΓ (υποθάλαμος-υπόφυση-γονάδες), ο οποίος αποτελεί τον βασικό άξονα ρύθμισης της λειτουργίας του αναπαραγωγικού συστήματος (Matzuk and Lamb 2008), οι ακτιβίνες λειτουργούν κυρίως με αυτοκρινή είτε παρακρινικό τρόπο, επηρεάζοντας στο επίπεδο της υπόφυσης την έκκριση της FSH θετικά, και στο επίπεδο των ωοθηκών, παραγόμενες από τα κοκκώδη κύτταρα, επηρεάζοντας την ωοθυλακιογένεση καθώς και τη στεροειδογένεση αυξάνοντας την ανταπόκριση των κοκκωδών στην FSH και μειώνοντας την παραγωγή ανδρογόνων από τα κύτταρα της θήκης (Hillier 2009; Knight and Glister 2001). Η ακτιβίνη Α θεωρείται η μόνη πρωτεΐνη των ακτιβινών που ανευρίσκεται στην κυκλοφορία, μπορώντας ενδεχομένως να επηρεάσει τον άξονα και ενδοκρινικά (αξίζει να σημειωθεί ότι η κύρια πηγή παραγωγής της ακτιβίνης Α παραμένει αδιευκρίνιστη, (Florio, et al. 2010b)), ενώ η ακτιβίνη Β θεωρείται ότι λειτουργεί κυρίως αυτοκρινικά και παρακρινικά στο επίπεδο της υπόφυσης (Muttukrishna, et al. 2004b). **Εικόνα 10** (Muttukrishna, et al. 2004b).



Muttukrishna 2004

**Εικόνα 10 :** Προτεινόμενος τρόπος δράσης των ακτιβινών και της φολλιστατίνης στον άξονα ΥΥΓ (Muttukrishna, et al. 2004b).

Καθώς στην εργασία αυτή θα αναφερθούν οι ρόλοι των ακτιβινών κυρίως στο ενδομήτριο, στις σάλπιγγες και στον πλακούντα, ο αναγνώστης κατευθύνεται για μία διεξοδική ανασκόπηση του ρόλου των ακτιβινών στην υπόφυση και στις ωοθήκες, στις εργασίες των (Bilezikjian, et al. 2012; Thackray, et al. 2010), και (Hillier 2009; Knight, et al. 2012) αντίστοιχα. Όσον αφορά το ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα, ανασκόπηση του ρόλου των ακτιβινών στην ανάπτυξη και λειτουργία των όρχεων έχει γίνει από τους (Hedger and Winnall 2012) και (Barakat, et al. 2012), ενώ η συμβολή των ακτιβινών στη ρύθμιση του άξονα ΥΥΓ στους άντρες, αναλύεται από τους (Jin and Yang 2014).

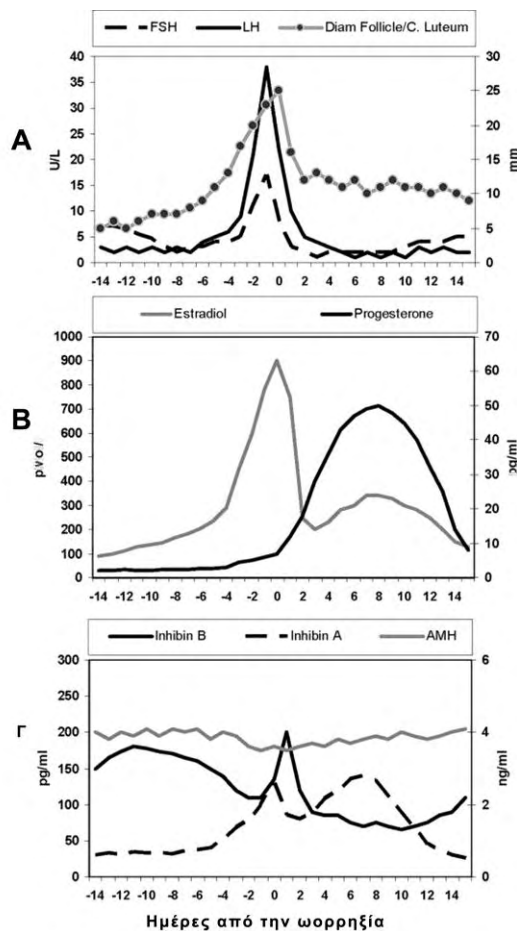
### Επίπεδα κατά τη διάρκεια του κύκλου και στην κύηση

Τα επίπεδα των πρωτεϊνών της οικογένειας αυτής κατά τη διάρκεια του κύκλου και της κύησης είναι καλύτερα προσδιορισμένα για τις ινχιμπίνες και τη φολλιστατίνη, ενώ λιγότερα δεδομένα υπάρχουν για τις ακτιβίνες.

Πιο συγκεκριμένα, η ινχιμπίνη Β παρουσιάζει υψηλά επίπεδα κατά την ωοθυλακική φάση, στη συνέχεια μειώνεται εμφανίζοντας μία αιχμή δύο μέρες μετά την αιχμή της LH, και παραμένει χαμηλή κατά την ωχρινική φάση μαρτυρώντας ότι παράγεται κυρίως από τα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια (Luisi, et al. 2005; Tong, et al. 2003). **Ένθετο** (Broekmans, et al. 2009). Η ινχιμπίνη Β δεν αυξάνεται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και τα επίπεδά της είναι μη ανιχνεύσιμα καθόλη τη διάρκειά της (Qu and Thomas 1998; Tong, et al. 2003), ενώ οι

(Fowler, et al. 1998) έχουν αναφέρει ότι η ινχιμπίνη Β παραμένει μη ανιχνεύσιμη μέχρι και τη 16<sup>η</sup> εβδομάδα ανάπτυξης, ενώ παρουσιάζει μία μικρή αύξηση στο τέλος του τρίτου τριμήνου. Σημεία παραγωγής της ενδέχεται να είναι ο πλακούντας και ο φθαρός καθώς η βΒ υπομονάδα έχει ανιχνευτεί στους ιστούς αυτούς (Jones, et al. 2006c; Qu and Thomas 1998).

Η ινχιμπίνη Α παραμένει σε χαμηλά επίπεδα μέχρι την ωοθυλακική φάση, παρουσιάζει μία αιχμή στο μέσον του κύκλου και αυξάνεται σε υψηλά επίπεδα κατά τη διάρκεια της ωχρινικής φάσης, υποδεικνύοντας ότι παράγεται από το κυρίαρχο ωοθυλάκιο καθώς και το ωχρο σώμα (Luisi, et al. 2005; Tong, et al. 2003). **Ένθετο** (Broekmans, et al. 2009). Η ινχιμπίνη Α παράγεται αρχικά από το ωχρο σώμα και είναι ανιχνεύσιμη από την 4<sup>η</sup> εβδομάδα ανάπτυξης, στη συνέχεια παρουσιάζει μία αύξηση γύρω στην 9<sup>η</sup> εβδομάδα ανάπτυξης μαρτυρώντας την αλλαγή της παραγωγή της από το ωχρο σώμα στην εμβρυοπλάκουντική μονάδα, ακολουθεί ένα διάστημα σταθερών



Επίπεδα ορμονών σε σχέση με την ημέρα ωορρηξίας  
Α) FSH και LH Β) οιστραδιόλη και προγεστερόνη  
Γ) ινχιμπίνη Α, ινχιμπίνη Β, AMH

2009 Broekmans

επιπέδων μέχρι την 20<sup>η</sup> εβδομάδα και πέραν αυτής αυξάνει μέχρι και το τέλος της κύησης (Luisi, et al. 2005; Tong, et al. 2003), ενώ τα επίπεδά της μειώνονται σε μη-ανιχνεύσιμα 24 ώρες μετά τον τοκετό, αναδεικνύοντας την πλακουντιακή προέλευσή της (Qu and Thomas 1998).

Τα επίπεδα της φολλιστατίνης στον ορό παραμένουν αμετάβλητα κατά τη διάρκεια του κύκλου (Messinis 2006; Muttukrishna, et al. 2004b), ενώ κατά τη διάρκεια της κύησης καταγράφονται από την 5<sup>η</sup> εβδομάδα ανάπτυξης παρουσιάζοντας αύξηση μέχρι και το τέλος της κύησης. (Fowler, et al. 1998). Με το πέρας του τοκετού τα επίπεδά της μειώνονται σταδιακά μέσα σε 8 με 30 μέρες (Qu and Thomas 1998), μαρτυρώντας και επιπρόσθετη περιοχή παραγωγής της πέραν του πλακούντα, η οποία ενδέχεται να είναι το ενδομήτριο (φθαρτός).

Τα επίπεδα της ακτιβίνης Α παρουσιάζουν αυξομειώσεις κατά τη διάρκεια του κύκλου, με υψηλά επίπεδα να εμφανίζονται κατά την αρχή της ωοθυλακικής φάσης, στη μέση του κύκλου και στο τέλος της ωχρινικής και μειωμένα επίπεδα στις ενδιάμεσες περιόδους. Η προοδευτική αύξηση της ακτιβίνης Α που ξεκινά στο μέσο της ωχρινικής φάσης και προηγείται της διακυκλικής αύξησης της FSH, ενδεχομένως εμπλέκει και την ακτιβίνη Α στο κρίσιμο στάδιο της κυκλικής στρατολόγησης των ωοθυλακίων (Messinis 2006; Mihm, et al. 2011). Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης η ακτιβίνη Α παρουσιάζει αύξηση κυρίως από την 7<sup>η</sup>-8<sup>η</sup> εβδομάδα ανάπτυξης, εμφανίζει σταθερά επίπεδα μέχρι την 24<sup>η</sup> εβδομάδα ανάπτυξης και στη συνέχεια αυξάνεται μέχρι και το τέλος της κύησης (Fowler, et al. 1998; Muttukrishna, et al. 1996). Η παρατήρηση ότι η αναλογία της ακτιβίνης Α προς τη δεσμευτική της πρωτεΐνη φολλιστατίνη μεταβάλλεται από 0,5 στην αρχή της κύησης (5<sup>η</sup> εβδομάδα) σε 1,8 κατά το τέλος του τρίτου τριμήνου (36<sup>η</sup> εβδομάδα) (Fowler, et al. 1998), μαρτυρά ότι ενδέχεται να έχει και ενδοκρινικό ρόλο κατά την περίοδο αυτή (Jones, et al. 2006c). Οι Jones, et al. (2006) έχουν καταγράψει επίσης, μία επιπλέον αύξηση της ακτιβίνης Α λίγο πριν την αρχή του τοκετού, εμπλέκοντας ίσως την ακτιβίνη Α στη διαδικασία έναρξής του (Jones, et al. 2006a; Jones, et al. 2006b), ωστόσο άλλα δεδομένα αμφισβητούν την άποψη αυτή (Schneider-Kolsky, et al. 2002). Τα επίπεδα της ακτιβίνης Α επιστρέφουν άμεσα μετά τον τοκετό στις προ-κύησης τιμές τους, καταδεικνύοντας τον πλακούντα ως την κύρια θέση παραγωγής της. (Qu and Thomas 1998).

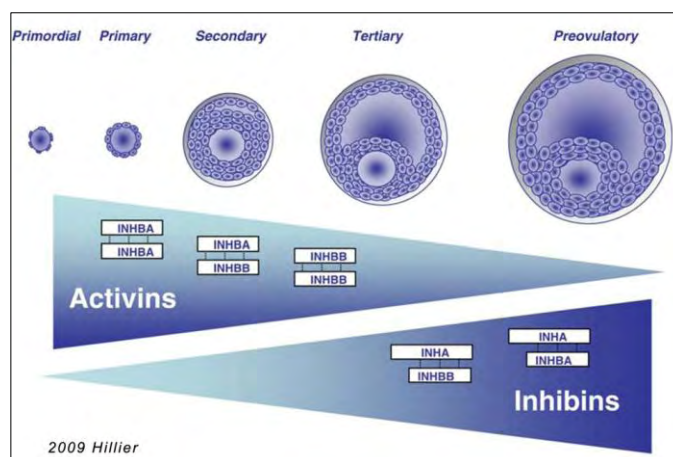
Τα δεδομένα για την ακτιβίνη Β είναι ελάχιστα και σε αυτό το γεγονός συνέβαλε μέγιστα και η καθυστέρηση στην ανάπτυξη αντιδραστηρίων ειδικών για την ανίχνευσή της (Ludlow, et al. 2009). Δύο μελέτες μέχρι στιγμής, έχουν αναφέρει ότι η ολική ακτιβίνη Β (ακτιβίνη Β και φολλιστατίνη) δεν παρουσιάζει διακύμανση στον ορό, κατά τη διάρκεια του κύκλου στις γυναίκες (Ludlow, et al. 2009; Vihko, et al. 1998), ενώ δεδομένα από ζώα (πρόβατα) αναφέρουν την έκφραση της ακτιβίνης Β κατά την ανάπτυξη των πρώιμων κοιλοτικών ωοθυλακίων, με τα επίπεδά της να μειώνονται καθώς προχωρούσε η ανάπτυξή τους (Young, et al. 2012). Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι κατά τη διάρκεια χορήγησης γοναδοτροπινών (HMG) σε κύκλους IVF, η ακτιβίνη Β εμφάνισε αρνητική συσχέτιση με τα αυξανόμενα επίπεδα οιστραδιόλης, δείχνοντας ότι ενδεχομένως η ακτιβίνη Β να δρα ανασταλτικά στη δράση της αρωματάσης κατά την ανάπτυξη των ωοθυλακίων (Vihko, et al. 1998). Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, όπως και το γεγονός ότι η βΒ υπομονάδα είναι κοινή τόσο στην ινχιμπίνη Β όσο και στην ακτιβίνη Β καθώς και ότι η έκφραση της ινχιμπίνης Β έχει καλά προσδιοριστεί στα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια, είναι ενδεχόμενο και η ακτιβίνη Β να συμμετέχει στην ίδια περίοδο του κύκλου (ωοθυλακική φάση).

Παράλληλα, ενδιαφέρον παρουσιάζει η ανίχνευση της ακτιβίνης Β σε δείγματα σιέλου, όπου παρατηρήθηκε διακύμανση στην ακτιβίνη Β κατά τη διάρκεια του κύκλου, με αυξημένα επίπεδα κατά την ωοθυλακική φάση και μία αιχμή την ημέρα πριν την μεσοκύκλια αύξηση της LH, ενώ ήταν σχεδόν μη ανιχνεύσιμη στους άντρες και παρουσίασε αύξηση σε

μετεμνηνοπαυσιακές γυναίκες υπό οιστρογονική θεραπεία, μαρτυρώντας ότι τα επίπεδα της ακτιβίνης Β στον σίελο επηρεάζονται από τις στεροειδείς ορμόνες του φύλου (Blauer, et al. 1996). Καθώς η ακτιβίνη Β βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα στην κυκλοφορία του αίματος και δεδομένα δείχνουν την ανάμειξή της στην ανάπτυξη των σιελογόνων αδένων κατά την ανθρώπινη εμβρυογένεση (Tuuri, et al. 1994), είναι ενδεχόμενο η ακτιβίνη Β να μην υπεισέρχεται μέσω της κυκλοφορίας όπως άλλες ορμόνες (Bosch 2014) αλλά να επηρεάζει τους σιελογόνους αδένες μέσω της τοπικής παραγωγής της.

Κατά τη διάρκεια της κύησης τα δεδομένα που αφορούν την ακτιβίνη Β είναι αντιφατικά και αναδεικνύουν περαιτέρω την ανάγκη για συγκεκριμένα αντιδραστήρια ειδικά για την ανίχνευσή της στον ορό, καθώς οι (Woodruff, et al. 1997) μετρώντας την ελεύθερη (μη δεσμευμένη στη φολλιστατίνη) ακτιβίνη Β κατέγραψε μη ανιχνεύσιμα επίπεδά της στην κύηση, ενώ οι (Vihko, et al. 1998) μετρώντας την ολική ακτιβίνη Β (ακτιβίνη Β και φολλιστατίνη) ανέφεραν την ανίχνευσή της μόνον μετά την 32<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης (σε 18 από τις 28 συνολικά γυναίκες, ενώ στις υπόλοιπες ήταν μη ανιχνεύσιμη) και οι Ludlow, et al. (2009) μετρώντας επίσης την ολική ακτιβίνη Β (αλλά με διαφορετικό αντίσωμα) ανέφεραν επίπεδα χαμηλότερα κατά τη διάρκεια της κύησης σε σχέση με τα επίπεδα σε μη εγκυμονούσες γυναίκες, τα οποία μάλιστα δεν παρουσίασαν μεταβολή σε κανένα τρίμηνο (να σημειωθεί ότι η μέτρηση έγινε σε μικρό αριθμό δειγμάτων ιδίως στο τρίτο τρίμηνο, n=4) (Ludlow, et al. 2009). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι δείγματα ορού από γυναίκες και άντρες που συμμετείχαν σε κύκλους IVF (χωρίς προσδιορισμό στον χρόνο λήψης), παρουσίασαν χαμηλότερα επίπεδα ακτιβίνης Β στον ορό σε σχέση με τα επίπεδα της ακτιβίνης Β στην ομάδα ελέγχου (Ludlow, et al. 2009). Με βάση τα παραπάνω ωστόσο, η ακτιβίνη Β ενδέχεται να ακολουθεί πορεία ανάλογη της ινχιμπίνης Β κατά τη διάρκεια της κύησης, με αποτέλεσμα τα επίπεδά της να είναι όντως χαμηλά, όπως έχουν αναφερθεί και για την ινχιμπίνη Β, τουλάχιστον μέχρι και το τέλος του τρίτου τριμήνου. Με παρόμοιο σκεπτικό, η ακτιβίνη Β ενδέχεται να συντίθεται από τον πλακούντα και τον φθαρτό, καθώς η βΒ υπομονάδα έχει ανιχνευτεί στους ιστούς αυτούς (Jones, et al. 2006c; Qu and Thomas 1998; Vihko, et al. 1998). Για τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των ακτιβινών δεν υπάρχουν δεδομένα, με την εξαίρεση της ακτιβίνης AB, η οποία έχει καταγραφεί να είναι μη ανιχνεύσιμη καθόλη τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (Fowler, et al. 1998). Η μαρτυρία αυτή ενισχύει περαιτέρω την εκδοχή ότι η βΒ υπομονάδα έχει χαμηλή έκφραση στην κύηση.

Τέλος αν και οι επιδράσεις των ακτιβινών στις ωοθήκες δεν θα περιγραφούν στην εργασία αυτή, εφόσον όμως ήδη έχουν αναφερθεί τα επίπεδα των πρωτεϊνών αυτών κατά τη διάρκεια του κύκλου, αξίζει να σημειωθεί το προτεινόμενο μοντέλο αλληλεπίδρασης των ακτιβινών και ινχιμπινών που οδηγεί τελικά στην ανάπτυξη και ωρίμανση του επικρατούντος ωοθυλακίου. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, οι μειούμενες συγκεντρώσεις των ακτιβινών κατά την ανάπτυξη των ωοθυλακίων από τα πρωτογενή στα προ-ωοθυλακιόρρηκτικά σε συνδυασμό με τις αυξανόμενες συγκεντρώσεις των ινχιμπινών οδηγούν στην επιλογή και ανάπτυξη του προ-ωοθυλακιόρρηκτικού ωοθυλακίου. Ασφαλώς οφείλει να σημειωθεί ότι, σε σχέση με τους παρακρινείς και αυτοκρινείς παράγοντες, στην πορεία αυτή συμμετέχουν και άλλα μέλη της υπερικογενείας του TGFβ, όπως οι AMH, TGFβ, GDF, και BMP, τα οποία συνολικά αλληλεπιδρώντας επιφέρουν το τελικό αποτέλεσμα. **Εικόνα 11** (Hillier 2009).

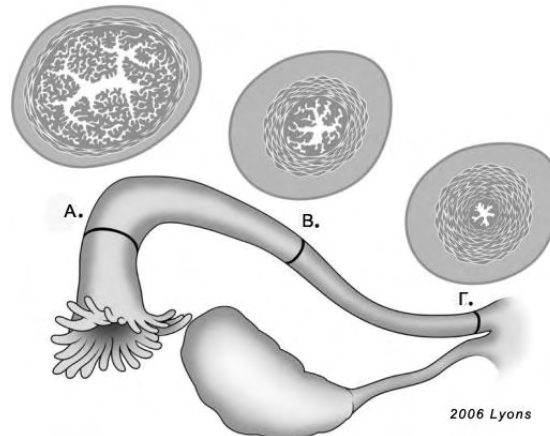


**Εικόνα 11 :** Μεταβολή στη σύνθεση των ακτιβινών και ινχιμπινών κατά την πορεία της ωοθυλακιογένεσης. Τα κοκκώδη κύτταρα των ωοθυλακίων από το στάδιο των πρωτογενών μέχρι και τα προκοιλιοτικά ωοθυλάκια εκφράζουν κυρίως β υπομονάδες (INHBA, INHBB) που διμερίζονται σχηματίζοντας τις ακτιβίνες A, B και AB. Οι ακτιβίνες επάγουν τον πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων, αυξάνουν την απάντηση στην FSH και αναστέλλουν την παραγωγή ανδρογόνων από τα κύτταρα θήκης. Τα κοκκώδη κύτταρα των κοιλιοτικών ωοθυλακίων υπό την επίδραση της FSH παράγουν αυξανόμενες ποσότητες της α υπομονάδας (INHA), η οποία διμερίζεται με τις β υπομονάδες δημιουργώντας τις ινχιμπίνες A και B. Τα ενδιάμεσης ωρίμανσης ωοθυλάκια παράγουν ινχιμπίνη B, ενώ το προωοθυλακιόρρηκτικό παράγει κυρίως ινχιμπίνη A. Και οι δύο τύποι ινχιμπινών αυξάνουν την παραγωγή ανδρογόνων από τα κύτταρα θήκης (Hillier 2009).

### Σάλπιγγες

Οι σάλπιγγες ή ωαγωγοί (salpinx, oviduct, tubes) είναι επιφορτισμένες με την απαραίτητη διαδικασία μεταφοράς των γαμετών και του αναπτυσσόμενου εμβρύου, που οδηγεί τελικά στην εμφύτευση του τελευταίου στην ενδομήτρια κοιλότητα της μήτρας. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αυτής, οι σάλπιγγες συνεργούν στα επιμέρους στάδια που οδηγούν στη γονιμοποίηση και περιλαμβάνουν τη μετακίνηση, αποθήκευση, και επιβίωση των σπερματοζωαρίων, όπως και την υποδοχή-πρόσληψη του ωαρίου από τις ωοθήκες και την μετέπειτα μετακίνησή του μέσα στις σάλπιγγες, ενώ στην περίπτωση επιτυχούς γονιμοποίησης συμμετέχουν στην ενίσχυση του εμβryo-μητρικού διαλόγου, στην υποστήριξη του αναπτυσσόμενου εμβρύου καθώς και στη ρυθμισμένη χρονικά μεταφορά του στο ενδομήτριο κατά τη φάση της μέγιστης υποδεκτικότητας του τελευταίου. Η πραγματοποίηση των παραπάνω δράσεων λαμβάνει χώρα μέσω της συντονισμένης δράσης των βλεφαριδοφόρων και λείων μυϊκών κυττάρων της σάλπιγγας, όπως και του σαλπιγγικού υγρού, η οποία συντελείται υπό τον έλεγχο μιας πλειάδας παραγόντων στους οποίους περιλαμβάνονται σήματα από το ενδοκρινολογικό και νευρικό σύστημα, καθώς και ενδεχομένως παρακρινικά σήματα από το ίδιο το έμβρυο. (Ezzati, et al. 2014; Lyons, et al. 2006).

Οι σάλπιγγες έχουν μήκος περίπου 9-11 εκατοστά και από τη μήτρα προς την ωοθήκη διαχωρίζονται στα τμήματα του διάμεσου, ισθμού, ληκύθου και κροσσωτού κώδωνα. Ιστολογικά οι σάλπιγγες αποτελούνται από τρία στρώματα, με την εσωτερική τους επιφάνεια να καλύπτεται από μονόστοιβο επιθήλιο, το οποίο εμφανίζει πτυχώσεις αυξανόμενου βαθμού κατά την πορεία της σάλπιγγας από τον διάμεσο προς το κώδωνα, ακολουθεί ο μυϊκός χιτώνας αποτελούμενος από λεία μυϊκά κύτταρα και η εξωτερική τους επιφάνεια καλύπτεται από περιτόναιο (Ezzati, et al. 2014; Lyons, et al. 2006). **Εικόνα 12** (Lyons, et al. 2006).



**Εικόνα 12 :** Σάλπιγγα με σχηματική αναπαράσταση των πτυχώσεων του επιθηλίου στο ύψος των τμημάτων των α) κώδωνα, β) λήκυθος, γ) ισθμός (Lyons, et al. 2006).

Το επιθήλιο των σαλπίγγων αποτελείται κυρίως από δύο κατηγορίες κυττάρων, τα βλεφαριδοφόρα και τα εκκριτικά, με τα τελευταία να είναι επικρατέστερα αριθμητικά σε σχέση με τα βλεφαριδοφόρα (Crow, et al. 1994), ενώ η παρουσία ενός τρίτου τύπου κυττάρων (ενδιάμεσα κύτταρα, intercalated/peg cells) τελεί υπό αμφισβήτηση (Ezzati, et al. 2014). Η λειτουργία των κυττάρων αυτών παρουσιάζει διακύμανση κατά τη διάρκεια του κύκλου, ρυθμιζόμενη από τα ωοθηκικά στεροειδή, με τα βλεφαριδοφόρα και εκκριτικά κύτταρα να αυξάνουν σε μέγεθος κατά την ωοθυλακική φάση (παραγωγική του ενδομητρίου) και τα εκκριτικά να εκκρίνουν το περιεχόμενό τους κατά τη διάρκεια της ωοθυλακιόρρηξης συντελώντας στην δημιουργία του σαλπιγγικού υγρού (Ezzati, et al. 2014; Lyons, et al. 2006), όπως και στην ψευδή εντύπωση ενός δίστοιβου επιθηλίου της σάλπιγγας, καθώς το μέγεθος των εκκριτικών κυττάρων μειώνεται μετά την απελευθέρωση του περιεχομένου τους σε σχέση με τα ισοϋψή τους αρχικά βλεφαριδοφόρα (Lyons, et al. 2006). Η κατανομή των κυττάρων αυτών παρουσιάζει επίσης διακύμανση τόσο κατά μήκος της σάλπιγγας, όσο και κατά τη διάρκεια του κύκλου, με τα βλεφαριδοφόρα κύτταρα να παρουσιάζονται σε μεγαλύτερους αριθμούς στην περιοχή του κώδωνα σε σχέση με την περιοχή του ισθμού και τα εκκριτικά κύτταρα να υπερέχουν κατά την ωχρινική φάση (Ezzati, et al. 2014; Lyons, et al. 2006).

Το σαλπιγγικό υγρό συναποτελείται από τις εκκρίσεις των εκκριτικών κυττάρων καθώς και από το ωοθυλακικό υγρό που απελευθερώνεται κατά την ωοθυλακιόρρηξη και εμπεριέχει προσταγλανδίνες και ωοθηκικά στεροειδή που επηρεάζουν το ρυθμό κίνησης των βλεφαρίδων καθώς και την σύσπαση των λείων μυϊκών ινών, ενώ επίσης είναι πλούσιο σε αμινοξέα, γλυκόζη και γλυκοπρωτεΐνες ειδικές των σαλπίγγων (TEP-1, TEP-2, tubal epithelial protein) (Ezzati, et al. 2014; Lyons, et al. 2006). (Leese, et al. 2001).

Ο ρυθμός της συχνότητας κίνησης των βλεφαρίδων (CBF, ciliary beat frequency), ο οποίος είναι εξαρτώμενος από το ασβέστιο και την υδρόλυση του ATP, έχει δείχθει ότι είναι ένας απαραίτητος παράγοντας για τη μεταφορά των γαμετών και του εμβρύου (Ezzati, et al. 2014; Lyons, et al. 2006), καθώς δεδομένα από γυναίκες με το σύνδρομο ακίνητων βλεφαρίδων (immotile cilia syndrome, Kartagener's syndrome) οι οποίες παρουσιάζουν υψηλή υπογονιμότητα (Halbert, et al. 1997), όπως και δεδομένα από πειράματα όπου αναστάληκε η μυϊκή λειτουργία των σαλπίγγων, ανέδειξαν ότι η κίνηση των βλεφαρίδων αφ' εαυτής είναι ικανή να μεταφέρει επιτυχώς τους γαμέτες. Η κεφαλαιώδους σημασία της συνδρομής της λειτουργίας των βλεφαρίδων καθώς και του CBF, περαιτέρω αναδεικνύεται από την αποδεδειγμένη μείωση της λειτουργίας τους, λόγω της παρουσίας (ή του ιστορικού) φλεγμονής προκαλούμενης από μικροοργανισμούς όπως οι γονόκοκκοι (*Neisseria gonorrhea*) και τα χλαμύδια (*Chlamydia trachomatis*) (Ezzati, et al. 2014; Lyons, et al. 2006).

Οι μυϊκές συσπάσεις των σαλπίγγων από την άλλη, διαχωρίζονται σε συνεχείς τονικές συσπάσεις και βραχυπρόθεσμες συχνές περιοδικές, με τις πρώτες να έχουν κύριο ρόλο στον έλεγχο του ισθμο-ληκυθικού κόμβου (AIJ, ampullary isthmic junction), ο οποίος συντελεί μεταξύ άλλων στη ρυθμισμένη χρονικά μεταφορά του εμβρύου στο ενδομήτριο, με το να συγκρατεί στην περιοχή αυτή το αναπτυσσόμενο έμβρυο (σύσπαση κόμβου) και να το απελευθερώνει (διαστολή κόμβου) υπό την επίδραση της αυξανόμενης προγεστερόνης, ενώ οι περιοδικές συσπάσεις θεωρείται ότι συμβάλλουν κυρίως στην ανάμειξη του σαλπιγγικού υγρού (Ezzati, et al. 2014). Τόσο η λειτουργία των λείων μυών όσο και η συχνότητα του ρυθμού κίνησης των βλεφαρίδων, ρυθμίζεται από ποικίλους παράγοντες που περιλαμβάνουν το αυτόνομο νευρικό σύστημα (διπτός ρόλος), τις στεροειδείς (διπτός ρόλος) και άλλες ορμόνες (επταγωγή) όπως η αγγειοτενσίνη II, οι προσταγλανδίνες και η αδρενομεδουλίνη (Ezzati, et al. 2014; Lyons, et al. 2006).

Οι ακτιβίνες έχουν βρεθεί να εκφράζονται μαζί με τους τύπου II υποδοχείς τους ActRIIA και ActRIIB στις σάλπιγγες προ και μετεμηνεπαυσιακών γυναικών και η ταυτόχρονη παρουσία της δεσμευτικής τους πρωτεΐνης φολλιστατίνης, μαρτυρά ότι οι δράσεις τους βρίσκονται υπό ρύθμιση (Refaat, et al. 2014). Επιπλέον, οι υπομονάδες βΑ και βΒ των ακτιβινών καθώς και η έκφραση των υποδοχέων τους και της φολλιστατίνης, έχουν αναφερθεί να παρουσιάζουν διακύμανση στην έκφρασή τους κατά μήκος των ωαγωγών, η οποία αυξάνεται από το τμήμα του ισθμού προς το τμήμα της ληκύθου (Refaat, et al. 2008).

Διακύμανση παρατηρείται επίσης στην έκφραση των παραπάνω πρωτεϊνών (βΑ,βΒ, ActRIIA, ActRIIB, φολλιστατίνη) και κατά τη διάρκεια του κύκλου, με το επίπεδο της έκφρασής τους να είναι χαμηλό κατά την ωοθυλακική φάση (παραγωγική ενδομητρίου) και να μεγιστοποιείται κατά την ωχρινική (εκκριτική ενδομητρίου), υποδεικνύοντας ότι βρίσκονται υπό τον έλεγχο των στεροειδών του φύλου. Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε ότι η έκφρασή τους ενισχύεται από την χοριακή γοναδοτροπίνη, καθώς η χορήγηση χοριακής κατά την μεσο-ωχρινική φάση διατήρησε τα επίπεδα της έκφρασης των παραπάνω πρωτεϊνών σε βαθμό υψηλότερο σε σχέση με την ωοθυλακική φάση, χαμηλότερο ωστόσο από το βαθμό έκφρασής τους κατά την ωχρινική (Refaat and Ledger 2011). Τα παραπάνω δεδομένα υποδηλώνουν ότι οι ακτιβίνες μπορεί να λαμβάνουν μέρος στη ρύθμιση της φυσιολογίας των σαλπίγγων μέσω παρακρινικού ή αυτοκρινικού τρόπου και η αύξησή τους κατά την ωχρινική φάση μαρτυρά ότι ενδεχομένως να εμπλέκονται επίσης στις διαδικασίες της γονιμοποίησης και της προεμφυτευτικής ανάπτυξης του εμβρύου (Refaat, et al. 2014; Refaat and Ledger 2011).

Σε σχέση με τη ρύθμιση της κινητικότητας των βλεφαρίδων και των συσπάσεων των λείων μυών των σαλπίγγων, δεν υπάρχουν άμεσα δεδομένα που να καταγράφουν την εμπλοκή των ακτιβινών. Ενδείξεις ωστόσο από τη δράση των ακτιβινών σε άλλα κύτταρα, όπου βρέθηκε ότι η ακτιβίνη Α μπορεί να επάγει την παραγωγή νιτρικού οξειδίου (NO, nitric oxide), ενός μορίου που αναστέλλει τη σύσπαση των λείων μυών των σαλπίγγων, όπως και η μείωση του ενδοκυττάριου ασβεστίου μετά από εξωγενή προσθήκη ακτιβίνης Α σε κύτταρα μυομητρίου, υποδηλώνουν ότι (εάν οι δράσεις αυτές επαληθευτούν και στα κύτταρα του επιθηλίου των ωαγωγών) οι ακτιβίνες θα μπορούσαν να παίρνουν μέρος στη μείωση της κινητικότητας των βλεφαρίδων μέσω μείωσης του ενδοκυττάριου ασβεστίου, καθώς και στη διαστολή των λείων μυϊκών κυττάρων μέσω της αύξησης της παραγωγής του νιτρικού οξειδίου, επηρεάζοντας με αυτόν τον τρόπο τη μεταφορά του αναπτυσσόμενου εμβρύου μέσω των σαλπίγγων (Refaat, et al. 2014).

## Ενδομήτριο

Το ενδομήτριο παρουσιάζει διαδοχικές μεταβολές αναδιάρθρωσης κατά τη διάρκεια του κύκλου, που περιλαμβάνουν τον πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση, απόπτωση και επιδιόρθωσή του, οι οποίες επαναλαμβάνονται κυκλικά κάθε 28 μέρες περίπου (Hawkins and Matzuk 2008; Jones, et al. 2006b; Mihm, et al. 2011). Ο βλεννογόνος του ενδομητρίου αποτελείται από επιθηλιακά κύτταρα που σχηματίζουν το επιφανειακό επιθήλιο και τους αδένες (ενδοθήλιο), καθώς και από μεσεγχυματικούς ινοβλάστες που αποτελούν το στρώμα, ενώ παράλληλα εμφανίζει και εκτεταμένη αγγείωση. Το ενδομήτριο διαχωρίζεται με βάση μορφολογικά χαρακτηριστικά στην βασική στοιβάδα, αποτελούμενη κυρίως από αδένες και πυκνό στρώμα, η οποία συνορεύει με το μυομήτριο και παραμένει αμετάβλητη κατά τη διάρκεια του κύκλου και στην επιφανειακή λειτουργική στοιβάδα (επιθήλιο και στρώμα), η οποία υφίσταται τις κυκλικές μεταβολές (Henriet, et al. 2012; Mihm, et al. 2011).

Οι μεταβολές αυτές της λειτουργικής στοιβάδας του ενδομητρίου αφορούν την αναγέννησή της μέσω πολλαπλασιασμού κατά τη διάρκεια της παραγωγικής φάσης υπό την επίδραση της οιστραδιόλης ( η παραγωγική φάση του ενδομητρίου αντιστοιχεί στην ωοθυλακική φάση των ωοθυλακίων), τη διαφοροποίησή της κατά τη διάρκεια της εκκριτικής φάσης (φθαρτοποίηση στρώματος, ανάπτυξη σπειροειδών αρτηριών, έκκριση γλυκογόνου και βλενοπρωτεϊνών (Henriet, et al. 2012)) υπό την επίδραση της προγεστερόνης ( η εκκριτική φάση του ενδομητρίου αντιστοιχεί στην ωχρινική φάση των ωοθυλακίων) καθώς και την απόρριψή της στην απουσία εγκυμοσύνης, λόγω απόσυρσης της δράσης κυρίως της προγεστερόνης, που οδηγεί στην έμμηνο ρύση (Hawkins and Matzuk 2008; Mihm, et al. 2011).

Οι αλλαγές της λειτουργικής στοιβάδας του ενδομητρίου κάτω από τον έλεγχο των στεροειδών του φύλου που οδηγούν στην ανάπτυξή της (πάχυνση) και στη διαφοροποίησή της ( φθαρτός χιτώνας), δημιουργούν το κατάλληλο περιβάλλον (μόρια προσκόλλησης, κυτταροκίνες, χυμοκίνες, αναπτυξιακοί παράγοντες ,(Refaat, et al. 2014)) και αποτελούν αναγκαίες προϋποθέσεις τόσο για την εμφύτευση της τροφοβλάστης όσο και για την ανάπτυξη του πλακούντα (Henriet, et al. 2012), ενώ ταυτόχρονα συντελούν στην απόρριψή της, γεγονός απαραίτητο για την επανέναρχη του κύκλου στην απουσία εγκυμοσύνης (Mihm, et al. 2011). Στην παρουσία εμφυτευμένης τροφοβλάστης η χοριακή (hCG), που εκκρίνεται από τον πλακούντα, αντικαθιστά την LH (χρησιμοποιώντας τους υποδοχείς της) και διασώζει το υποστρεφόμενο ωχρο σωματίο, οδηγώντας το να συνεχίσει να παράγει οιστραδιόλη, προγεστερόνη και ινχιμπίνη Α, διατηρώντας με αυτόν τον τρόπο και επεκτείνοντας ταυτόχρονα περαιτέρω τη φθαρτοποίηση της λειτουργικής στοιβάδας του ενδομητρίου ώστε να μπορεί να υποστηρίξει την κύηση (Hawkins and Matzuk 2008; Mihm, et al. 2011).

Οι ακτιβίνες εμφανίζοντας κυκλική διακύμανση στην έκφρασή τους στο ενδομήτριο κατά τη διάρκεια του κύκλου (Florio, et al. 2010b; Jones, et al. 2002), σχετίζονται με τη φθαρτοποίηση κατά την εκκριτική φάση και με την επιδιόρθωση του ενδομητρίου κατά τη διάρκεια της έμμηνο ρύσης, ενώ στην παρουσία τροφοβλάστης παίρνουν μέρος στον εμβryo-μητρικό διάλογο, επάγοντας τη δημιουργία του διεισδυτικού τύπου εξωλαχνικής τροφοβλάστης (iEVT, invasive extra villous trophoblast) καθώς και βοηθώντας στη δημιουργία και λειτουργία του νεοσχηματιζόμενου πλακούντα. Επιπλέον, οι ακτιβίνες ενδέχεται να συμμετέχουν στη ρύθμιση του ανοσολογικού περιβάλλοντος του ενδομητρίου κατά τη διάρκεια του κύκλου και της αρχόμενης κύησης, μέσω του διπλού τους ρόλου τόσο στην επαγωγή όσο και στον έλεγχο της ανοσολογικής απόκρισης (Jones, et al. 2002; Jones, et al. 2006c). Τέλος, μία ακόμα ενδεχόμενη λειτουργία των ακτιβινών μπορεί να είναι η συμμετοχή τους στην αγγειογένεση, όπως έχει προταθεί από τους (Jones, et al. 2002).



## Έκφραση στο ενδομήτριο

Η έκφραση της οικογένειας των ακτιβινών στο ενδομήτριο έχει μελετηθεί κυρίως στο επίπεδο πρωτεΐνης με ανοσοϊστοχημεία και ανοσοφθορισμό και σε λίγες περιπτώσεις στο επίπεδο mRNA. Καθώς τα αντιδραστήρια που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι διαφορετικά, εμφανίζοντας διαφορετικές ιδιότητες (ειδικότητα ανίχνευσης, απουσία αλληλεπίδρασης, κα), ασυνέπειες υπάρχουν ως προς τα αναφερόμενα επίπεδα έκφρασης και για τον λόγο αυτό ο αναγνώστης οφείλει να είναι προσεκτικός ως προς τα δεδομένα που συναντά στη βιβλιογραφία.

Η έκφραση στο ενδομήτριο, τόσο της βΑ υπομονάδας όσο και της βΒ υπομονάδας των ακτιβινών, εντοπίζεται κυρίως στο στρώμα κατά την παραγωγική φάση, ενώ τα επίπεδα των υπομονάδων είναι χαμηλά και ενδεχομένως μη ανιχνεύσιμα στα ίδια κύτταρα κατά την εκκριτική φάση (τα δεδομένα ωστόσο των (Mylonas, et al. 2004) παρουσιάζουν ανίχνευση στα κύτταρα του στρώματος και κατά την εκκριτική φάση) (Florio, et al. 2010b; Jones, et al. 2002). Έκφραση των υπομονάδων αυτών εντοπίζεται επίσης και στα επιθηλιακά κύτταρα του επιφανειακού επιθηλίου, όπως και στο ενδοθήλιο των αδένων καθόλη τη διάρκεια του κύκλου (Jones, et al. 2002; Mylonas, et al. 2004), με (ενδεχόμενη) αύξηση στην έκφραση των υπομονάδων στα κύτταρα των αδένων (Florio, et al. 2010b; Mylonas, et al. 2004) και του επιφανειακού επιθηλίου (Refaat, et al. 2014) κατά την εκκριτική φάση. **Εικόνα 13** (Florio, et al. 2010b). Στο ενδομήτριο έχουν πρόσφατα επίσης ανιχνευτεί και οι βC και βE υπομονάδες των ακτιβινών, με την βC να ανιχνεύεται και στα κύτταρα του στρώματος και στους αδένες χωρίς διακύμανση κατά τη διάρκεια του κύκλου και την βE να εμφανίζει αύξηση στην έκφρασή της και στους αδένες και στο στρώμα κατά την εκκριτική φάση (Mylonas, et al. 2010).

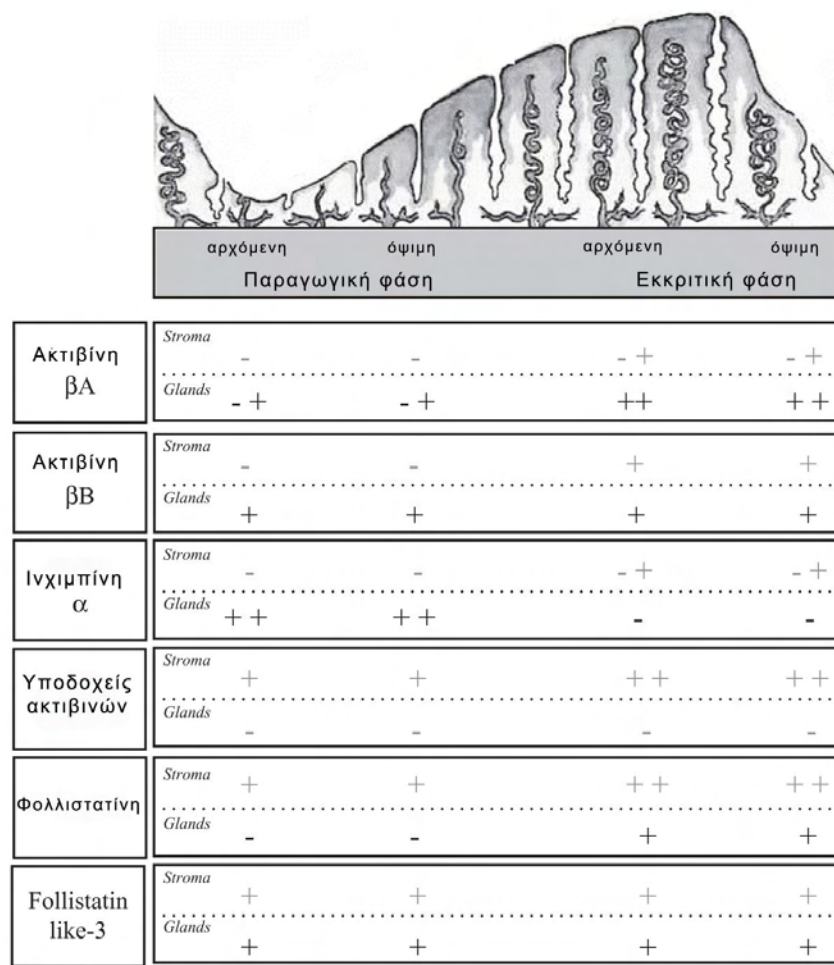
Η έκφραση της άλφα υπομονάδας των ινχιμπινών είναι χαμηλή τόσο στα επιθηλιακά κύτταρα και στους αδένες όσο και στο στρώμα κατά την παραγωγική φάση, ενώ αυξάνεται αισθητά μόνο στα κύτταρα του στρώματος κατά την περίοδο φθαρτοποίησης ( τα δεδομένα των (Mylonas, et al. 2004) παρουσιάζουν ανίχνευση της άλφα υπομονάδας και στους αδένες και στο στρώμα κατά την παραγωγική φάση, όπως και αύξησή τους κατά την εκκριτική) (Florio, et al. 2010b; Jones, et al. 2002). **Εικόνα 13** (Florio, et al. 2010b). Δεδομένα σε επίπεδο mRNA μαρτυρούν ότι η έκφραση και των τριών παραπάνω υπομονάδων στον φθαρτό (βΑ, βΒ, άλφα) αυξάνουν κατά την εγκυμοσύνη, με μέγιστη έκφραση κατά το τρίτο τρίμηνο (Jones, et al. 2002). Επίσης η βήτα γλυκάνη, η απαραίτητη πρωτεΐνη (ψευδο-υποδοχέας) για την ανασταλτική δράση των ινχιμπινών σε επίπεδο σηματοδότησης (Santibanez, et al. 2011), παρουσιάζει έκφραση στα κύτταρα του στρώματος, η σύνθεση της οποίας αυξάνει στον φθαρτό της αρχόμενης εγκυμοσύνης, υποδεικνύοντας ότι η δράση των ινχιμπινών είναι ιδιαίτερα σημαντική κατά την εμφύτευση και τη δημιουργία του πλακούντα (Jones, et al. 2002) .

Οι υποδοχείς των ακτιβινών ( ACVR1IA, ACVR1IB, ALK4, ALK7) έχουν ανιχνευτεί τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και πρωτεΐνης στα κύτταρα του στρώματος (Florio, et al. 2010b; Jones, et al. 2002), καθώς και στο αγγειακό ενδοθήλιο (Jones, et al. 2002) αλλά όχι στο επιθήλιο των αδένων (Florio, et al. 2010b). Η έκφρασή τους παρουσιάζει αύξηση κατά την εκκριτική φάση καθώς και στην αρχόμενη εγκυμοσύνη (Florio, et al. 2010b; Jones, et al. 2002). **Εικόνα 13** (Florio, et al. 2010b)

Η κύρια δεσμευτική πρωτεΐνη των ακτιβινών φολλιστατίνη εκφράζεται στο στρώμα και στο επιθήλιο των αδένων, με την έκφρασή της να παρουσιάζει σχετική αύξηση στην εκκριτική φάση του ενδομητρίου και σημαντική αύξηση στην αρχόμενη εγκυμοσύνη (Jones, et al. 2002) (Florio, et al. 2010b), μαρτυρώντας, μέσω της κοινής τοποθεσίας της έκφρασής της με τους υποδοχείς και τις υπομονάδες των ακτιβινών στο φθαρτοποιημένο στρώμα, ότι η δράση των

ακτιβινών δέχεται σημαντική ρύθμιση κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης της τροφοβλάστης και της δημιουργίας του πλακούντα (Jones, et al. 2002). Αντίστοιχο ρόλο ενδέχεται να έχει και η FSTL3, η οποία ανιχνεύεται σε σταθερά επίπεδα κατά τη διάρκεια του κύκλου στο στρώμα και στους αδένες και παρουσιάζει αύξηση κατά την αρχόμενη κύηση (Florio, et al. 2010b). **Εικόνα 13** (Florio, et al. 2010b).

Στο επίπεδο της έκκρισης των πρωτεϊνών τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν ότι τα επιθηλιακά κύτταρα μπορούν να συνθέσουν τόσο ακτιβίνες όσο και ινχιμπίνες κατά την παραγωγική φάση του ενδομητρίου (Jones, et al. 2002), *in vitro* δεδομένα ωστόσο καλλιέργειας επιθηλιακών κυττάρων αναφέρουν ότι η παραγωγή ακτιβίνης Α είναι 1000 φορές περισσότερη από αυτήν της ινχιμπίνης, υποδεικνύοντας ότι τα επιθηλιακά κύτταρα παράγουν κατά κύριο λόγο ακτιβίνη Α (Jones, et al. 2006b). Αντίστοιχα, κατά την εκκριτική φάση μόνο οι βήτα υπομονάδες των ακτιβινών ανιχνεύονται στα επιθηλιακά κύτταρα συντελώντας στην παραγωγή μόνο ακτιβινών (Florio, et al. 2010b; Jones, et al. 2002). Τα κύτταρα στρώματος με βάση τα δεδομένα έκφρασης μπορούν να συνθέσουν και ακτιβίνες και ινχιμπίνες μόνο κατά την εκκριτική φάση του κύκλου (Jones, et al. 2002). Σημαντικό είναι το γεγονός ότι η μέτρηση της ακτιβίνης Α σε δείγματα ενδομητρίων εκπλύσεων συσχετίζεται με τις μέρες του κύκλου και το πάχος του ενδομητρίου, αναδεικνύοντας ότι η ακτιβίνη Α ανευρίσκεται στην ενδομήτρια κοιλότητα κατά τη φάση της εμφύτευσης καθώς και ότι η κύρια πηγή της είναι το φθαρτοποιημένο στρώμα (Refaat, et al. 2014).



2010 Florio

**Εικόνα 13** : Ανοσοϊστοχημική διαφορά έκφρασης κατά τη διάρκεια του κύκλου στα κύτταρα του στρώματος και στα επιθηλιακά κύτταρα των αδένων των εξής πρωτεϊνών: βΑ, βΒ και άλφα υπομονάδα των ακτιβινών, υποδοχείς ακτιβινών, φολλιστατίνη και FSTL-3. (Florio, et al. 2010b).

## Έμμηνος ρύση και επιδιόρθωση ενδομητρίου

Η διαδικασία της φθαρτοποίησης της λειτουργικής στοιβάδας κατά την εκκριτική φάση του ενδομητρίου είναι σημαντική τόσο για την εμφύτευση της τροφοβλάστης όπως θα αναλυθεί παρακάτω, καθώς και για την έναρξη της έμμηνου ρύσης. Κάτω από την μείωση της προγεστερόνης, λόγω υποστροφής του ωχρού σωματίου στην απουσία κύησης, πραγματοποιείται εισροή λευκοκυττάρων, δράση των προσταγλανδινών και αύξηση της σύνθεσης του VEGF (vascular endothelial growth factor). Μετά το σημείο αυτό, η πορεία είναι μη αναστρέψιμη και δεν επηρεάζεται πλέον από την προγεστερόνη (Henriet, et al. 2012; Mihm, et al. 2011). Τα λευκοκύτταρα καθώς και τα κύτταρα του ενδομητρίου εκκρίνουν μέταλλο πρωτεϊνάσες (MMPs, matrix metalloproteinases) που οδηγούν στην αποδόμηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ECM, extra cellular matrix) (Gaide Chevronnay, et al. 2012; Mihm, et al. 2011), οι προσταγλανδίνες προκαλούν συσπάσεις στο μυομήτριο και αγγειοδιαστολή στις σπειροειδείς αρτηρίες οδηγώντας στην εξαγγείωση του αίματος, ενώ ταυτόχρονα συντελείται η αιμόσταση από την θρομβίνη της βασικής στοιβάδας και η δημιουργία της νέας λειτουργικής στοιβάδας υπό την επίδραση της οιστραδιόλης (Mihm, et al. 2011).

Η αποδόμηση της λειτουργικής στοιβάδας, ξεκινά από σημεία του επιφανειακού επιθηλίου στα οποία χάνεται η συνοχή της εξωθεμέλιας ουσίας και επεκτείνεται στη συνέχεια προοδευτικά σε όλη το λειτουργικό επιθήλιο του ενδομητρίου (Henriet, et al. 2012). Στη διαδικασία αυτή συμμετέχουν ένζυμα όπως η πλασμίνη (plasmin), η οποία μπορεί να πέψει στοιχεία της ECM (φιμπρονεκτίνη, λαμίνη, κολλαγόνο) και να ενεργοποιήσει τις MMPs και την έκκριση κυτοκινών, καθώς και οι λυσοσωματικές καθεψίνες (cathepsins) που παρουσιάζουν παρόμοια δράση (Gaide Chevronnay, et al. 2012; Henriet, et al. 2012).

Οι μέταλλο πρωτεϊνάσες MMPs ή ματριξίνες (matrixins) αποτελούν μία ομάδα ενζύμων με 23 γνωστά μέλη στον άνθρωπο, τα οποία μπορούν να διασπάσουν τα περισσότερα στοιχεία της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, καθώς και να ενεργοποιήσουν ή να αποδομήσουν κυτταροκίνες, χυμοκίνες (Gaide Chevronnay, et al. 2012; Henriet, et al. 2012) και αναπτυξιακούς παράγοντες (growth factors) (Henriet, et al. 2012). Οι περισσότερες MMPs συνθέτονται ως πρόδρομα μόρια που ενεργοποιούνται από άλλους παράγοντες όπως η πλασμίνη, οι καλλικρεΐνες (kallikreins), άλλες ήδη ενεργές MMPs, και από τα ουδετερόφιλα (Gaide Chevronnay, et al. 2012; Henriet, et al. 2012). Μπορούν επιπλέον να αποθηκευτούν και να εκκριθούν από κυστίδια των ουδετερόφιλων (MMPs 8,9,25), όπως και να συντεθούν από τα μακροφάγα (MMP 9) (Henriet, et al. 2012).

Η έκφραση των MMPs παρουσιάζει διακύμανση στο ενδομήτριο κατά τη διάρκεια του κύκλου και τα διάφορα μέλη της ομάδας αυτής παίρνουν μέρος τόσο κατά τη φθαρτοποίηση κατά την εκκριτική φάση, όσο και στην απόρριψη της λειτουργικής στοιβάδας και στην επαναδημιουργία της κατά την παραγωγική φάση (Gaide Chevronnay, et al. 2012; Henriet, et al. 2012). Η δράση τους βρίσκεται υπό των έλεγχου στεροειδών ορμονών όπως η προγεστερόνη, που δρα εμμέσως ανασταλτικά στην έκφρασή τους, πιθανόν μεταβάλλοντας τη συγκέντρωση κυτοκινών και χυμοκινών (Gaide Chevronnay, et al. 2012), ενώ σε τοπικό επίπεδο ο έλεγχός τους συντελείται μέσω της δέσμευσή τους με την α2 μακρογκλομπουλίνη, μέσω των αναστολέων των MMPs που εκφράζονται στο ενδομήτριο, καθώς και από άλλους παράγοντες όπως ο TGFβ (ενδεχομένως διπλός ρόλος), οι ακτιβίνες (επαγωγή) και ο TNFα (επαγωγή) (Gaide Chevronnay, et al. 2012; Henriet, et al. 2012). Αξίζει να σημειωθεί ότι η αρνητική δράση της προγεστερόνης πάνω στην έκφραση των MMPs, αίρεται όταν η παρουσία της προγεστερόνης είναι συνεχόμενη (Gaide Chevronnay, et al. 2012).

Η πιθανή εμπλοκή των ακτιβινών στην έμμηνο ρύση και στην επιδιόρθωση της λειτουργικής στοιβάδας του ενδομητρίου, προκύπτει από παρατηρήσεις που αφορούν την έκφραση των βήτα υπομονάδων της σε ανοσοκύτταρα, την επαγωγή των MMPs από κύτταρα του ενδομητρίου, όπως και από το συσχετισμό της εδραιωμένης δράσης τους κατά την επούλωση πληγών, με την πιθανή δράση τους στην επανα-επιθηλιοποίηση κατά την αναγέννηση της λειτουργικής στοιβάδας (Jones, et al. 2002; Jones, et al. 2006c).

Πιο συγκεκριμένα, μακροφάγα και ουδετερόφιλα του ενδομητρίου έχουν βρεθεί να εκφράζουν την βΑ υπομονάδα, ενώ μακροφάγα και μαστοκύτταρα (σιτευτικά κύτταρα, mast cells –γερμανικός όρος) έχουν αναφερθεί να εκφράζουν την βΒ υπομονάδα, και καθώς η διαδικασία της αποδόμησης περιλαμβάνει τη δράση των μακροφάγων και ουδετερόφιλων που οδηγεί στην έκκριση των MMPs, οι ακτιβίνες έχει προταθεί ότι μπορεί να εμπλέκονται στη διαδικασία αυτή επάγοντας την έκκριση των MMPs (Jones, et al. 2006c). Επιπλέον, οι ακτιβίνες (ακτιβίνη Α) έχει δείχθει ότι μπορούν επάγουν την έκκριση των MMPs και από κύτταρα της λειτουργικής στοιβάδας του ενδομητρίου, όπως της ενεργής MMP-2 από φθαρτοποιημένα κύτταρα του στρώματος, και των πρόδρομων MMP 2,3,7,9 από τα επιθηλιακά κύτταρα (Jones, et al. 2006b). Οι δράσεις των ακτιβινών στην επαγωγή των MMPs ασφαλώς και μπορεί να συνδέεται με τη διαδικασία φθαρτοποίησης του ενδομητρίου (Florio, et al. 2010b; Jones, et al. 2006b), καθώς όμως οι MMP 2 και 9 αυξάνονται και κατά την έμμηνο ρύση (Gaide Chevonnay, et al. 2012; Henriot, et al. 2012) και η επαγωγή της MMP-2 θεωρείται κρίσιμη για την έναρξη της έμμηνου ρύσης (Florio, et al. 2010b), οι ακτιβίνες ενδέχεται να συντελούν και στη διαδικασία αυτή (Jones, et al. 2006c).

Κατά τη διάρκεια επούλωσης πληγών έχει παρατηρηθεί μία διαφορετική έκφραση χρονικά και τοπικά των ακτιβινών Α και Β, με την βΑ υπομονάδα να εκφράζεται κυρίως κατά την οξεία φάση της φλεγμονής από εισερχόμενα λευκοκύτταρα και την βΒ υπομονάδα να αυξάνεται στα μεταναστεύοντα κερατινοκύτταρα και να παραμένει αυξημένη μέχρι και την επανα-επιθηλιοποίηση της πληγής (Jones, et al. 2006c). Αντίστοιχα διαφορετική έκφραση έχει καταγραφεί και στην έκφραση των ακτιβινών σε κύτταρα του ενδομητρίου, με την βΑ υπομονάδα να εκφράζεται από εισερχόμενα λευκοκύτταρα κατά την οξεία φάση της ανοσολογικής απόκρισης και την βΒ υπομονάδα να εκφράζεται από τοπικά μακροφάγα του ενδομητρίου κατά την αναγέννηση και πολλαπλασιασμό του ενδομητρίου (Jones, et al. 2002; Jones, et al. 2006c). Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι οι ακτιβίνες Α και Β μπορεί να έχουν διαφορετική δράση στο ενδομήτριο κατά την έμμηνο ρύση και την επιδιόρθωση της λειτουργικής στοιβάδας, με την ακτιβίνη Α να εμπλέκεται κυρίως στην οξεία φάση έναρξης της ανοσολογικής απόκρισης και την ακτιβίνη Β με την επιδιόρθωση του ιστού (Jones, et al. 2002; Jones, et al. 2006c).

Η εμπλοκή των ακτιβινών κατά την έμμηνο ρύση και την επιδιόρθωση της λειτουργικής στοιβάδας, ενισχύεται επίσης και από τα δεδομένα των (Kaitu'u-Lino, et al. 2009), οι οποίοι παρατήρησαν ότι η προσθήκη ακτιβίνης Α σε *in vitro* μοντέλο ανθρώπινων κυττάρων ενδομητρίου μετά από επαγωγή πληγής, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της επανα-επιθηλιοποίησης και της επούλωσης της πληγής, ενώ σε μοντέλο ζώων με υπερέκφραση της δεσμευτικής των ακτιβινών πρωτεΐνης φολλιστατίνη, παρατηρήθηκε σημαντική καθυστέρηση στην επιδιόρθωση του ενδομητρίου.

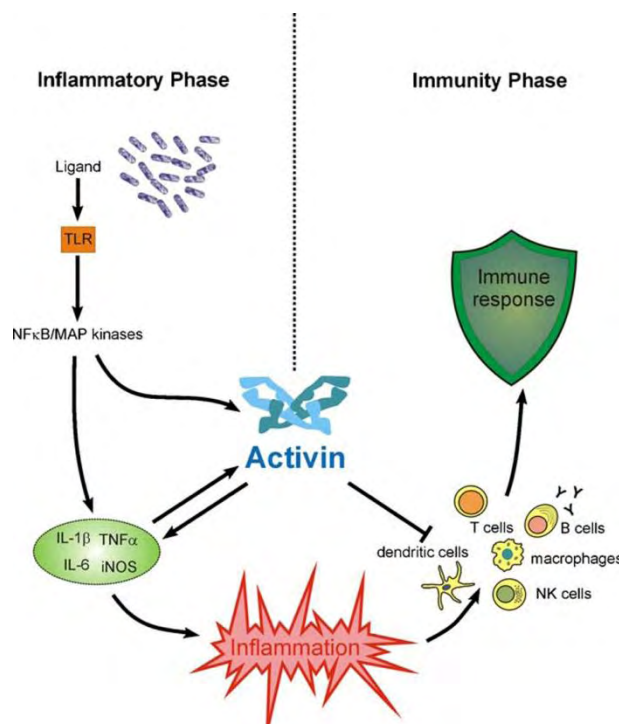
#### Αγγειογένεση ενδομητρίου

Στη διάρκεια του κύκλου η αγγειογένεση λαμβάνει χώρα κατά την επιδιόρθωση της λειτουργικής στοιβάδας και την αναγέννησή της στην παραγωγική φάση, όπως και κατά την διαφοροποίηση των σπειροειδών αρτηριών κατά την εκκριτική φάση του ενδομητρίου. Οι

υπομονάδες των ακτιβινών  $\beta A$  και  $\beta B$ , όπως και οι υποδοχείς τους και η δεσμευτική τους πρωτεΐνη φολλιστατίνη έχουν βρεθεί να εκφράζονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα του ενδομητρίου και καθώς η ακτιβίνη A έχει αναφερθεί να έχει ανασταλτικές δράσεις στην αγγειογένεση και η φολλιστατίνη να αυξάνεται κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων βοηθώντας στην αγγειογένεση, οι Jones, et.al.(2002) έχουν προτείνει ότι οι ακτιβίνες ενδέχεται να συμμετέχουν στην διαδικασία αυτή. Την άποψη αυτή ενισχύει η παρατήρηση ότι η ακτιβίνη A μπορεί να επάγει τη σύνθεση του αγγειογενετικού παράγοντα VEGF καθώς και των υποδοχέων του σε αορτικά ενδοθηλιακά κύτταρα (Jones, et al. 2002). Η πιθανή αυτή δράση των ακτιβινών εάν επιβεβαιωθεί και στα κύτταρα του ενδομητρίου, τότε ενδέχεται η ακτιβίνη A να συμβάλλει επίσης και στην εκτεταμένη αγγειογένεση που λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της πλακουντοποίησης (Ji, et al. 2013).

#### Ανοσολογική ρύθμιση περιβάλλοντος μήτρας

Οι ακτιβίνες (κυρίως η A) έχουν περιγραφεί με διπλό ρόλο στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης. Καθώς η πρώτη ονομασία της ακτιβίνης A ήταν παράγοντας διαφοροποίησης των ερυθροποιητικών κυττάρων (erythroid differentiation factor ) είναι εμφανές ότι η πρωτεΐνη αυτή συμμετέχει στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των κυττάρων της μυελικής και λεμφικής σειράς κατά την πορεία της ερυθροποίησης καθώς και στη ρύθμιση των λειτουργιών των κυττάρων αυτών (Hedger and de Kretser 2013; Jones, et al. 2006c; Phillips, et al. 2009).



Ο διπλός της ρόλος γίνεται εμφανής με τις αντίθετες δράσεις που επιφέρει ανάλογα με σύνολο των αλληλεπιδρώντων παραγόντων στην πορεία της ανοσολογικής απόκρισης όπως είναι η επαγωγή πολλαπλασιασμού των T κυττάρων και η επαγωγή της διαφοροποίησης υποομάδας αυτών σε ρυθμιστικά Treg (T regulatory) καθώς και η αντίθετη δράση αναστολής της ενεργοποίησης των T κυττάρων που έχουν αναφερθεί. Αντίστοιχα, στα B λεμφοκύτταρα μπορεί να επάγει τον πολλαπλασιασμό τους και την παραγωγή αντισωμάτων καθώς και την απόπτωσή τους. Σε μονοκύτταρα και μακροφάγα μπορεί να επάγει ή να αναστείλει την παραγωγή παραγόντων φλεγμονής όπως οι IL1β, IL6, TNFα, και iNOs (inducible nitric oxide synthase), ανάλογα με τη συγκέντρωσή της και την

ενεργοποιημένη ή μη κατάσταση των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, σε μη- ενεργοποιημένα μονοκύτταρα και μακροφάγα η ακτιβίνη A σε χαμηλές συγκεντρώσεις επάγει την έκκριση των παραπάνω παραγόντων, ενώ σε ήδη ενεργοποιημένα μονοκύτταρα και μακροφάγα η ακτιβίνη A σε μεγάλες συγκεντρώσεις αναστέλλει την έκκρισή τους. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι η ακτιβίνη A μπορεί να έχει τόσο προφλεγμονώδη δράση επάγοντας την ανοσολογική απόκριση στην οξεία φάση καθώς και αντιφλεγμονώδη δράση μειώνοντας την απόκριση στη φλεγμονή (Hedger and de Kretser 2013; Phillips, et al. 2009). (**Ενθετο** (Phillips, et al. 2009)). [Ο διπλός ρόλος της ακτιβίνης A στην φλεγμονή και την ανοσολογική απάντηση. Η ακτιβίνη A μπορεί να ενεργοποιηθεί μέσω των TLRs υποδοχέων και να επιτρέψει την παραγωγή φλεγμονωδών παραγόντων όπως οι IL-1β , TNFα, IL-6 και iNOs, προάγοντας έτσι την έναρξη της φλεγμονώδους αντίδρασης (inflammatory phase). Η παραγωγή της ακτιβίνης A επάγεται επίσης από την IL-1β και τον TNFα,

δημιουργώντας με αυτόν τον τρόπο θετική ανατροφοδότηση. Ωστόσο, η ακτιβίνη A έχει κυρίως ανασταλτική δράση σε ήδη ενεργοποιημένα μυελικά και λεμφικά κύτταρα, υποδηλώνοντας ότι έχει ανοσορρυθμιστικό ρόλο κατά τη διάρκεια της ανοσολογικής απόκρισης (*immune phase*). Με αυτόν τον τρόπο, η ακτιβίνη λειτουργεί ως ένας διακόπτης που μπορεί να επάγει και να αναστείλει την ανοσολογική απόκριση].

Μία πλειάδα κυττάρων παράγουν ακτιβίνη A όπως τα μονοκύτταρα, μακροφάγα, δένδριτικά, ενδοθηλιακά, καθώς και ενεργοποιημένα μαστοκύτταρα και CD4+T λεμφοκύτταρα (Phillips, et al. 2009), ενώ τα ουδετερόφιλα φέρουν επίσης αποθηκευμένη ακτιβίνη A σε κυστίδια που μπορούν να την απελευθερώσουν άμεσα χωρίς ανάγκη για σύνθεσή της. Η τελευταία αυτή παρατήρηση έχει αξία καθώς μπόρεσε να εξηγήσει την διφασικής μορφής ανίχνευση της ακτιβίνης A μετά από επαγωγή φλεγμονής σε μοντέλα ζώων (ποντίκια). Πιο συγκεκριμένα, μετά από επαγωγή φλεγμονής, η ακτιβίνη A αυξήθηκε άμεσα μέσα σε μία ώρα στο αίμα (που αντιστοιχεί στην απελευθέρωσή της από τα κυστίδια των ουδετερόφιλων), ενώ ακολούθησε και μία δεύτερη αύξησή της αρκετές ώρες μετά την επαγωγή της φλεγμονής αντιστοιχούσα στην μεταγραφική ενεργοποίηση και σύνθεση της ακτιβίνης. Σημαντικό είναι ότι κατά τη δεύτερη φάση αύξησης της ακτιβίνης A, παρατηρήθηκε και αύξηση στην κυκλοφορία της φολλιστατίνης όπως και της ακτιβίνης B. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι η ακτιβίνη A συμμετέχει και στις δύο φάσεις της ανοσολογικής απόκρισης, ενώ η ακτιβίνη B εμπλέκεται κυρίως στην επίλυση της φλεγμονής (Hedger and de Kretser 2013).

Με βάση τα παραπάνω δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι οι ακτιβίνες έχουν βρεθεί σε υψηλά επίπεδα στην κυκλοφορία σε καταστάσεις οξείας και χρόνιας φλεγμονής όπως η σηψαιμία, μηνιγγίτιδα, εγκεφαλικό τραύμα, έγκαυμα, ρευματοειδής αρθρίτιδα και φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, καθώς και ότι τα επίπεδα ιδίως της ακτιβίνης A μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικός δείκτης για την σοβαρότητα των παραπάνω καταστάσεων (Hedger and de Kretser 2013; Phillips, et al. 2009).

Σε σχέση με το περιβάλλον της μήτρας έχει ήδη αναφερθεί η διαφορετική έκφραση των ακτιβινών A και B σε μακροφάγα (έκφραση A και B ακτιβίνης), ουδετερόφιλα (έκφραση A ακτιβίνης) και μαστοκύτταρα (έκφραση B ακτιβίνης) του στρώματος του ενδομητρίου (Jones, et al. 2006c; Phillips, et al. 2009). Επιπλέον, μελέτες αναφέρουν ότι οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL1β, TNFα μπορούν να επάγουν την έκφραση ακτιβίνης A σε κύτταρα του φθαρτού, του πλακούντα και του άμνιου, καθώς και ότι η ακτιβίνη A μπορεί σε χαμηλή συγκέντρωση να επάγει την IL1 (κύτταρα άμνιου), και σε υψηλές συγκεντρώσεις να αναστείλει την έκκριση τόσο της IL1β όσο και του TNFα (φθαρτός, πλακούντας). Τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν ότι οι ακτιβίνες ενδέχεται να επηρεάζουν τοπικά το ανοσολογικό περιβάλλον της μήτρας όπως και να έχουν επίδραση στους ιστούς του κύησης. Οι υψηλές συγκεντρώσεις ακτιβίνης A που ανευρίσκονται στην κυκλοφορία γυναικών με προ-εκλαμψία κατά τη διάρκεια της κύησης, μπορεί να οφείλονται στην προσπάθεια ρύθμισης της εκτεταμένης φλεγμονώδους αντίδρασης που χαρακτηρίζει την κατάσταση αυτή (Muttukrishna, et al. 2004a; Muttukrishna, et al. 2004b).

#### Φθαρτοποίηση ενδομητρίου

Η διαδικασία διαφοροποίησης της λειτουργικής στοιβάδας του ενδομητρίου (φθαρτοποίηση) ξεκινά κατά το μέσον της εκκριτικής φάσης του ενδομητρίου υπό τη δράση των στεροειδών του φύλου, οιστραδιόλη και (κυρίως) προγεστερόνη (Plaisier 2011) και είναι ανεξάρτητη (αρχικά) της παρουσίας τροφοβλάστης (Florio, et al. 2010b). Στην απουσία κύησης, η μείωση της προγεστερόνης κατά το τέλος της εκκριτικής φάσης οδηγεί στην αποδιοργάνωση και απόρριψη της λειτουργικής στοιβάδας, ενώ στην παρουσία τροφοβλάστης, η χοριακή γοναδοτροπίνη συντηρεί το ωχρό σωματίο ώστε να συνεχίσει να παράγει οιστραδιόλη και

προγεστερόνη, οδηγώντας στην επέκταση της φθαρτοποίησης της λειτουργικής στοιβάδας (Jones, et al. 2006c).

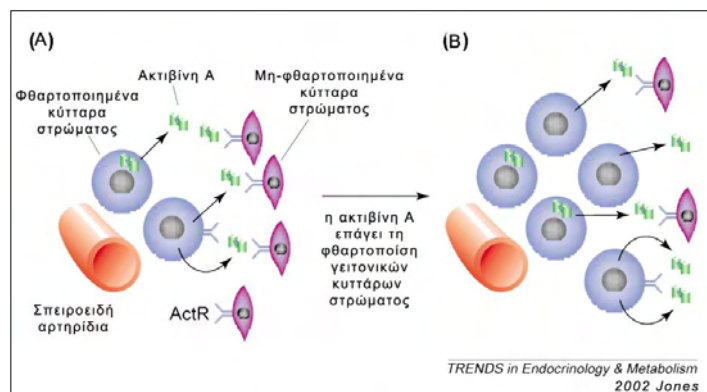
Η διαδικασία αυτή ξεκινά από τα κύτταρα στρώματος που περιβάλλουν τις σπειροειδείς αρτηρίες και επεκτείνεται προοδευτικά κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου στην υπόλοιπη λειτουργική στοιβάδα (Jones, et al. 2006c), δημιουργώντας μαζί με τη δράση των μητρικών NK (natural killer) και της εξωλαχνικής τροφοβλάστης (EVT, extra villous trophoblast) τρεις υποτύπους του φθαρτού χιτώνα (decidua basalis, decidua parietalis, secretory decidua) (Plaisier 2011). Κατά τη διαδικασία αυτή η λειτουργική στοιβάδα υφίσταται ευρεία αναδιοργάνωση, που περιλαμβάνει τον πολλαπλασιασμό και τη φθαρτοποίηση των κυττάρων του στρώματος, την αλλαγή της διαπερατότητας των αγγείων καθώς και την αγγειογένεση και αναδιαμόρφωση των αγγείων (Plaisier 2011). *[Να σημειωθεί ότι στην αγγλική ορολογία ο όρος angiogenesis, περιγράφει την επέκταση ήδη υπαρχόντων αγγείων, ενώ ο παρεμφερής όρος vasculogenesis περιγράφει την δημιουργία (γένεση) αγγείων (Plaisier 2011)]*.

Τα κύτταρα του στρώματος διαφοροποιούνται από ινοβλαστικής-μορφής επιμήκη μεσεγγυματικά κύτταρα σε επιθηλιακού-τύπου ευμεγέθη στρογγυλά εκκριτικά κύτταρα (Weimar, et al. 2013), (Jones, et al. 2002), τα οποία περιβάλλονται από συγκεκριμένου (φθαρτού) τύπου εξωκυττάρια θεμέλια ουσία πλούσια σε λαμινίνη, κολλαγόνο, φιμπρονεκτίνη και εκκρίνουν μία σειρά κυτταροκινών και αναπτυξιακών παραγόντων όπως IL11, IL15, dPRL (decidual prolactin), IGFBP-1 (Insulin like growth factor binding protein 1) (Florio, et al. 2010b; Weimar, et al. 2013), μεταξύ των οποίων η dPRL και IGFBP-1, θεωρούνται δείκτες της φθαρτοποίησης (Gellersen, et al. 2010). Η διαδικασία της φθαρτοποίησης της λειτουργικής στοιβάδας είναι απαραίτητη για την υποστήριξη της κύησης συμβάλλοντας στην ανοσολογική ανοχή της τροφοβλάστης, επιτρέποντας την εμφύτευση και ελέγχοντας το βαθμό διείσδυσης της τροφοβλάστης στα μητρικά τοιχώματα, ενώ παράλληλα δημιουργεί ένα κατάλληλο περιβάλλον για την προστασία της τροφοβλάστης από στρεσογόνους παράγοντες καθώς και για την ανάπτυξη του εμβρύου (Blois, et al. 2011; Weimar, et al. 2013). Πέραν των στεροειδών ορμονών (κυρίως P4), σε τοπικό επίπεδο μία πλειάδα παραγόντων συμβάλλουν και ενέχονται στη διαδικασία της φθαρτοποίησης, μεταξύ των οποίων οι IL11, ρηλαξίνη (RLX, relaxin), προσταγλανδίνη PGE2 (prostaglandin E2), CRH (corticotrophin releasing hormone), TGFβ, BMP2, και η ακτιβίνη A (Menkhorst, et al. 2010).

Τόσο η έκφραση των βΑ και βΒ υπομονάδων των ακτιβινών που αυξάνεται κατά τη φθαρτοποίηση στα κύτταρα του στρώματος, όσο και η έκφραση των υποδοχέων της ακτιβίνης και της δεσμευτικής των ακτιβινών φολλιστατίνης την ίδια περίοδο, μαρτυρούν την εμπλοκή των ακτιβινών στη διαδικασία της φθαρτοποίησης (Jones, et al. 2002; Jones, et al. 2006c). Σε κύτταρα καλλιέργειας στρώματος ενδομητρίου, η προσθήκη ακτιβίνης Α έχει δείχθει να επάγει τη φθαρτοποίηση με τρόπο αναστρέψιμο τόσο από τη φολλιστατίνη, όσο και από την ινχιμπίνη Α (Jones, et al. 2006c). Ο τρόπος δράσης της στα κύτταρα του στρώματος διαμεσολαβείται πιθανόν μέσω των MMPs, αφού σε φθαρτοποιημένα κύτταρα η ακτιβίνη Α έχει αναφερθεί να επάγει την έκκριση της ενεργής MMP-2 (Jones, et al. 2006b) και ενδεχομένως και μέσω άλλων παραγόντων που προωθούν την φθαρτοποίηση, αφού η ακτιβίνη Α έχει επίσης αναφερθεί να επάγει την προσταγλανδίνη PGE2 (Jones, et al. 2002).

**Εικόνα 14** (Jones, et al. 2002).





**Εικόνα 14 :** Πιθανές παρακρινικές είτε αυτοκρινικές δράσεις της ακτιβίνης Α κατά τη φθαρτοποίηση του ενδομητρίου. Η φθαρτοποίηση ξεκινά από τα κύτταρα στρώματος που περιβάλλουν τα σπειροειδή αρτηρίδια και εξελίσσεται προοδευτικά στο ενδομήτριο στην περίπτωση εγκυμοσύνης. Κατά τη φθαρτοποίηση, τα κύτταρα του στρώματος αυξάνουν σε μέγεθος και γίνονται στρογγυλά ξεκινώντας να παράγουν ακτιβίνη Α. Η ακτιβίνη Α προωθεί τη φθαρτοποίηση των κυττάρων του στρώματος *in vitro*. Προτείνεται με βάση αυτόν τον λόγο, ότι τα φθαρτοποιημένα κύτταρα του στρώματος που περιβάλλουν τα σπειροειδή αρτηρίδια παράγουν ακτιβίνη Α, η οποία μπορεί με παρακρινικό τρόπο να δράσει στα γειτονικά μη φθαρτοποιημένα στρωματικά κύτταρα και να επάγει τη διαφοροποίησή τους. Με αυτόν τον τρόπο, η ακτιβίνη μπορεί ενδεχομένως να πραγματοποιήσει την εξέλιξη της φθαρτοποίησης στο υπόλοιπο ενδομήτριο (Jones, et al. 2002).

Η έκκριση της ακτιβίνης Α έχει αναφερθεί να επάγεται από την προγεστερόνη και την IL1β σε κύτταρα στρώματος (Florio, et al. 2010b; Florio, et al. 2007a). Επίσης η ακτιβίνη Α έχει καταγραφεί να αυξάνει την έκκριση της IL11, καθώς και τη φθαρτοποίηση του στρώματος όταν συνδυάζεται εξωγενώς με την IL11 (Menkhorst, et al. 2010). Σε μοντέλα ζώων, η ακτιβίνη Α έχει δείχτει να επάγει επίσης την απόπτωση, μέσω κασπασών, των φθαρτοποιημένων κυττάρων (Tessier, et al. 2003), ενώ η προλακτίνη, ένας γνωστός μάρτυρας της φθαρτοποίησης των κυττάρων η οποία εμποδίζει τη φθαρτοποίηση σε ανθρώπινα κύτταρα (Eyal, et al. 2007), αναφέρθηκε να αναστέλλει την έκφραση της ακτιβίνης Α σε φθαρτοποιημένα κύτταρα (Tessier, et al. 2003), υποδηλώνοντας ότι η δράση της ακτιβίνης μπορεί να συντελεί επίσης και στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των φθαρτοποιημένων κυττάρων απομακρύνοντας κάποια μέσω απόπτωσης. Σε σχέση με την ακτιβίνη Β, τα δεδομένα είναι περιορισμένα και μόνο μία μελέτη έχει αναφέρει την αύξηση της βΒ υπομονάδας, με τρόπο χρονο-εξαρτώμενο, κατά την επαγωγή φθαρτοποίησης κυττάρων στρώματος ενδομητρίου *in vitro* (Horne, et al. 2008). Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι και η ακτιβίνη Β ενδέχεται να συντελεί στη διαδικασία της φθαρτοποίησης.

#### Ρύθμιση αρχόμενης εμβρυϊκής ανάπτυξης

Η παρουσία των υποδοχέων της ακτιβίνης στα ανθρώπινα έμβρυα στο στάδιο της βλαστοκύστης, με την ταυτόχρονη έκφραση των σηματοδοτικών μορίων SMAD (2,3,7) και της δεσμευτικής των ακτιβινών πρωτεΐνης φολλιστατίνη, υποδηλώνει ότι οι ακτιβίνες μπορούν να επάγουν μηνύματα στο αναπτυσσόμενο έμβρυο. Η προσθήκη εξωγενούς ακτιβίνης Α έχει δείχθει να επηρεάζει την εμβρυϊκή ανάπτυξη σε έμβρυα ζώων, αυξάνοντας τον αριθμό των κυττάρων της βλαστοκύστης, βελτιώνοντας το ρυθμό εκκόλαψής της, όπως και επάγοντας απόπτωση (ρυθμίζοντας ενδεχομένως τη φυσιολογική ομοιόσταση) στα βλαστομερίδια (Jones, et al. 2006c).

Καθώς οι υποδοχείς των ακτιβινών αρχίζουν να εκφράζονται στο στάδιο της βλαστοκύστης, όταν αρχίζουν επίσης να εκφράζονται οι υπομονάδες βΑ και βΒ των ακτιβινών κυρίως στην

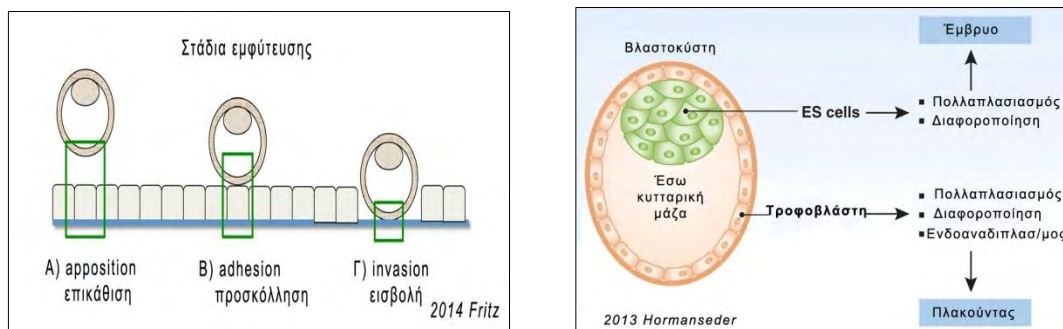


έσω κυτταρική μάζα (Jones, et al. 2006c), η χρονική έκφραση των πρωτεϊνών αυτών υποδεικνύει ότι σχετίζεται με το αναπτυξιακό στάδιο του εμβρύου καθώς και με την ενεργοποίηση του εμβρυϊκού γονιδιώματος (Refaat, et al. 2014). Η δράση των ακτιβινών στο στάδιο αυτό θεωρείται ότι διαμεσολαβείται κυρίως μέσω των μητρικών ακτιβινών (Jones, et al. 2006c). Αργότερα κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη οι ακτιβίνες εμπλέκονται στην γαστριδιοποίηση και στην οργανογένεση και εκφράζονται από πληθώρα ιστών του εμβρύου (Jones, et al. 2002; Jones, et al. 2006c).

### Πλακούντας

Ο πλακούντας είναι ένα παροδικό όργανο με απαραίτητη και ζωτική σημασία κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, τόσο για την επιβίωση και υγεία του εμβρύου όσο και της μητέρας. Ευρισκόμενος ανάμεσα στο έμβρυο και τη μητέρα λειτουργεί ως ένας διαμεσολαβητής, ο οποίος συμμετέχει στην ανταλλαγή αερίων, θρεπτικών και άχρηστων υλικών, στην προστασία του εμβρύου από την ανοσολογική απάντηση της μητέρας, καθώς και στην παραγωγή ορμονών και αναπτυξιακών παραγόντων απαραίτητων για την υποστήριξη της κύησης (Huppertz, et al. 2014; Ji, et al. 2013).

Η εμφύτευση του εμβρύου είναι μια διαδικασία που περιλαμβάνει τρία στάδια, της επικάθισης, προσκόλλησης και διείσδυσης, τα οποία συμβαίνουν με μία συνεχή και προοδευτική πορεία και εξαρτώνται τόσο από την ποιότητα του εμβρύου, όσο και από την υποδεκτικότητα του ενδομητρίου (Cavagna and Mantese 2003). **Εικόνα 15** (Fritz, et al. 2014). Στην διαδικασία αυτή απαραίτητο ρόλο, για την επικείμενη δημιουργία του πλακούντα, έχει η ικανότητα του τροφοεξωδέρματος της βλαστοκύστης να διαφοροποιείται, η οποία ρυθμίζεται από ορμόνες, αναπτυξιακούς παράγοντες καθώς και από την συγκέντρωση του οξυγόνου (Ji, et al. 2013).



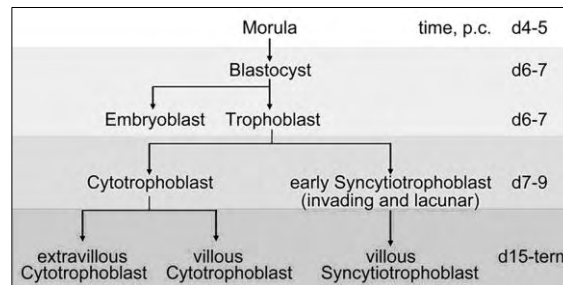
**Εικόνα 15** (Αριστερά): Στάδια εμφύτευσης τροφοβλάστης: α)επικάθιση, β)προσκόλληση, γ) εισβολή/ διείσδυση (Fritz, et al. 2014). **Εικόνα 16** (Δεξιά): Σχηματική απεικόνιση βλαστοκύστης και της πορείας διαφοροποίησης των επιμέρους κυττάρων της (Hormanseder, et al. 2013).

Το τροφοεξώδερμα (ή τροφοβλάστη) προερχόμενο από την έξω κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης, είναι ο ιστός που θα δημιουργήσει την εμβρυϊκή πλευρά του πλακούντα. **Εικόνα 16** (Hormanseder, et al. 2013). Η τροφοβλάστη πολλαπλασιαζόμενη και διαφοροποιούμενη δίνει αρχικά γένεση στην κυτταροτροφοβλάστη (CTB, cytotrophoblast), η οποία μπορεί περαιτέρω να διαφοροποιηθεί μέσω δύο μονοπατιών.

Στην πρώτη πορεία (λαχνική, villous), τα κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης CTB συγχωνεύονται δημιουργώντας την πολύ-πυρηνική συγκυτιοτροφοβλάστη (STB, syncytiotrophoblast), η οποία πραγματοποιεί την αρχική διείσδυση στο μητρικό επιθήλιο και

μετέπειτα την ανταλλαγή αερίων και θρεπτικών μεταξύ μητέρας και εμβρύου, όπως και την παραγωγή χοριονικής γοναδοτροπίνης (hCG) και πλακουντιακού γαλακτογόνου (hPL).

Στο δεύτερο μονοπάτι (εξωλαχνικό, extra villous) τα κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης CTB σχηματίζουν κυτταρικές κολώνες από αγκιστρωτικές λάχνες, οι οποίες προσκολλώνται στο ενδομήτριο. Από τις κυτταρικές αυτές κολώνες, εξωλαχνικά τροφοβλαστικά κύτταρα (EVT, extra villus trophoblast) δημιουργούνται αποχωριζόμενα από τις λάχνες του πλακούντα, τα οποία στη συνέχεια μεταναστεύουν στον φθαρτό χιτώνα του ενδομητρίου. Τα κύτταρα της εξωλαχνικής τροφοβλάστης EVT περαιτέρω διαφοροποιούνται σε δύο κυρίως τύπους, τα ενδο-ιστικού ή διεισδυτικού τύπου κύτταρα iEVT (interstitial, invasive), τα οποία είναι υπεύθυνα για την αγκίστρωση του εμβρύου στο ενδομήτριο και τα οποία τελικώς διαφοροποιούνται στα γιγάντια κύτταρα του πλακούντα παράγοντας hPL και hCG, καθώς και στα αγγειακού τύπου vEVT κύτταρα (vascular), τα οποία συμμετέχουν στην αναδιαμόρφωση των σπειροειδών αρτηριών του ενδομητρίου και στην εγκαθίδρυση της πλακουντιακής κυκλοφορίας (Huppertz, et al. 2014; Ji, et al. 2013). **Εικόνα 17** (Huppertz 2008).



**Εικόνα 17 :** Διαγραμματική απεικόνιση της αναπτυξιακής πορείας της τροφοβλάστης. Η πρώτη αναπτυξιακή διαφοροποίηση της τροφοβλαστικής σειράς κατά το στάδιο της βλαστοκύστης, ακολουθείται από τον διαχωρισμό της κυτταροτροφοβλάστης και της συγκυτιοτροφοβλάστης, και κατόπιν συμβαίνει η διαφοροποίηση σύμφωνα με το λαχνικό ή το εξωλαχνικό μονοπάτι. Δεξιά παρουσιάζονται οι μέρες μετά τη γονιμοποίηση (p.c., post coitum)(Huppertz 2008).

Οι ακτιβίνες, εκφραζόμενες κυρίως από τον φθαρτό του ενδομητρίου, συμμετέχουν στον εμβryo-μητρικό διάλογο και επηρεάζουν τη διαδικασία εμφύτευσης της βλαστοκύστης, ενώ κατόπιν λαμβάνουν μέρος στη διαφοροποίηση της τροφοβλάστης και στην παραγωγή ορμονών από την συγκυτιοτροφοβλάστη.

#### Ρύθμιση τροφοβλάστης

Η αρχική επαφή της τροφοβλάστης με το τοίχωμα του ενδομητρίου πραγματοποιείται περίπου επτά ημέρες μετά τη γονιμοποίηση και περιλαμβάνει τον εμβryo-μητρικό διάλογο των σταδίων της επικάθισης και προσκόλλησης, το τελικό αποτέλεσμα του οποίου είναι η υιοθέτηση μιας σταθερής θέσης της τροφοβλάστης επάνω στη λειτουργική στοιβάδα (Blois, et al. 2011; Gellersen, et al. 2010). Μόλις χαθεί η συνέχεια του εξωτερικού επιθηλίου της λειτουργικής στοιβάδας, ο εμβryo-μητρικός διάλογος περνά στο στάδιο της εμφύτευσης και περιλαμβάνει κυρίως την αλληλεπίδραση του φθαρτού με την τροφοβλάστη, ο οποίος οδηγεί τελικά, υπό φυσιολογικές συνθήκες, στην πλήρη ενσωμάτωση της βλαστοκύστης μέσα στον φθαρτό χιτώνα, περίπου δέκα ημέρες μετά τη γονιμοποίηση (Gellersen, et al. 2010). Η διαδικασία ωστόσο της εισβολής ή διείσδυσης της τροφοβλάστης συνεχίζεται, με το αποκορύφωμα της δραστηριότητάς της να πραγματοποιείται μεταξύ της 5<sup>ης</sup> και της 12<sup>ης</sup> εβδομάδας κύησης, ώστε να εγκαθιδρύσει τον πλακουντιακό ιστό της κύησης (Jones, et al. 2006c).

Η διαδικασία της εισβολής της τροφοβλάστης στον φθαρτό επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες που παίρνουν μέρος στον εμβryo-μητρικό διάλογο και πραγματοποιείται, όπως έχει ήδη αναφερθεί, μέσω της διαφοροποίησης των κυτταροτροφοβλαστικών κυττάρων σε κύτταρα διεισδυτικού τύπου εξωλαχνικής τροφοβλάστης (iEVT) (Ji, et al. 2013). Τα κύτταρα αυτά εκφράζουν ένα σύνολο μορίων προσκόλλησης (adhesion molecules), χημειοτακτικών (chemotactic) υποδοχέων και πρωτεασών που τους επιτρέπουν να μετακινηθούν και να εισβάλλουν στον φθαρτό (Jones, et al. 2006c). Σε σχέση με τις πρωτεάσες, οι σημαντικότερες που έχουν αναφερθεί να εκφράζονται από τα iEVT είναι η MMP-2 και η MMP-9, και καθώς τόσο τα iEVT κύτταρα όσο και τα κύτταρα στρώματος του φθαρτού έχουν βρεθεί να εκφράζουν ταυτόχρονα και πρωτεάσες MMPs και τους αναστολείς τους (TIMPs), το τελικό αποτέλεσμα της εισβολής φαίνεται να είναι μία αυστηρά ρυθμιζόμενη διαδικασία (Ji, et al. 2013).

Οι ακτιβίνες εμπλέκονται στη ρύθμιση της εμφύτευσης και εισβολής της τροφοβλάστης με δύο τρόπους, είτε επηρεάζοντας την ίδια την τροφοβλάστη είτε επηρεάζοντας τα κύτταρα του στρώματος. Στην πρώτη περίπτωση, η ακτιβίνη A έχει βρεθεί ότι μπορεί να επάγει την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των κυτταροβλαστικών κυττάρων CTB σε διεισδυτικού τύπου iEVT, καθώς και να επάγει την έκκριση της MMP-2 από τα κυτταροβλαστικά κύτταρα CTB *in vitro*, υποδηλώνοντας ότι παίρνει μέρος στην διαφοροποίηση της τροφοβλάστης και στη ρύθμιση της διεισδυτικής της ικανότητας (Jones, et al. 2006c). Η δράση αυτή της ακτιβίνης A έχει προσδιοριστεί χρονικά να συμβαίνει μέχρι και την 10<sup>η</sup> εβδομάδα ανάπτυξης κάτω από τον έλεγχο της φολλιστατίνης, αφού *in vitro* πειράματα δείχνουν ότι η εξωγενής χορήγηση ακτιβίνης A αύξησε την διεισδυτική ικανότητα κυττάρων CTB μεταξύ των 6-10 εβδομάδων ανάπτυξης και η δράση της αυτή στη συνέχεια αναστάλθηκε σημαντικά από τη φολλιστατίνη μεταξύ των 10-12 εβδομάδων ανάπτυξης (Bearfield, et al. 2005).

Ταυτόχρονα οι ακτιβίνες μπορεί να επηρεάζουν και την έκφραση των μορίων προσκόλλησης (CAMs, cellular adhesion molecules) των κυττάρων της τροφοβλάστης μεταβάλλοντας την ικανότητα προσκόλλησης και διείσδυσης της τελευταίας, αφού τα δεδομένα των (Stoikos, et al. 2010) δείχνουν ότι η ακτιβίνη A μπορούσε να μειώσει την έκφραση ιντεγκρινών (integrins) και επομένως και την ικανότητα προσκόλλησης των κυττάρων της τροφοβλάστης, ενώ η μελέτη των (Li, et al. 2013) ανέφερε ότι και οι ακτιβίνες B και AB, πέραν της ακτιβίνης A, μπορούσαν να αυξήσουν την διεισδυτική ικανότητα των κυττάρων της τροφοβλάστης, μέσω αύξησης της έκφρασης της N καντχερίνης (N cadherin). Οι δράσεις αυτές των ακτιβινών θεωρείται ότι συμβαίνουν μέσω των μητρικών παραγόμενων ακτιβινών από τα κύτταρα του στρώματος, καθώς η έκφραση της ακτιβίνης A είναι χαμηλή στα κύτταρα διεισδυτικού τύπου εξωλαχνικής τροφοβλάστης iEVT (Jones, et al. 2006c).

Τα κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης εμφανίζουν μεγαλύτερη κινητικότητα στην παρουσία εκχυλισμάτων φθαρτού, υποδηλώνοντας ότι η ταυτόχρονη παρουσία τροφοβλάστης και φθαρτού είναι ένα αλληλεπιδρόν σύστημα (Jones, et al. 2006c). Αντίστοιχα, η παρουσία τροφοβλαστικών κυττάρων έχει δείξει να μπορεί να επηρεάζει τα κύτταρα του στρώματος (ESC, endometrial stromal cells) ως προς την δική τους κινητικότητα και διεισδυτικότητα. Οι ικανότητες αυτές των κυττάρων στρώματος του φθαρτού, θεωρείται ότι συμβάλλουν τόσο κατά την αναδιάρθρωση της λειτουργικής στοιβάδας του ενδομητρίου, όσο και κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης και εισβολής της τροφοβλάστης. Η διεισδυτικού τύπου συμπεριφορά των ESCs έχει προταθεί ότι συμβάλει στην ενεργητική περικύκλωση της βλαστοκύστης που συμβαίνει κατά την εμφύτευση. Η ιδιότητα αυτή εν μέρει μπορεί να βασίζεται στην έκφραση των πρωτεασών MMPs από τα κύτταρα ESC που τους επιτρέπει να διασπούν την εξωθεμέλια ουσία καθώς κινούνται (Gellersen, et al. 2010; Weimar, et al. 2013). Η ακτιβίνη A

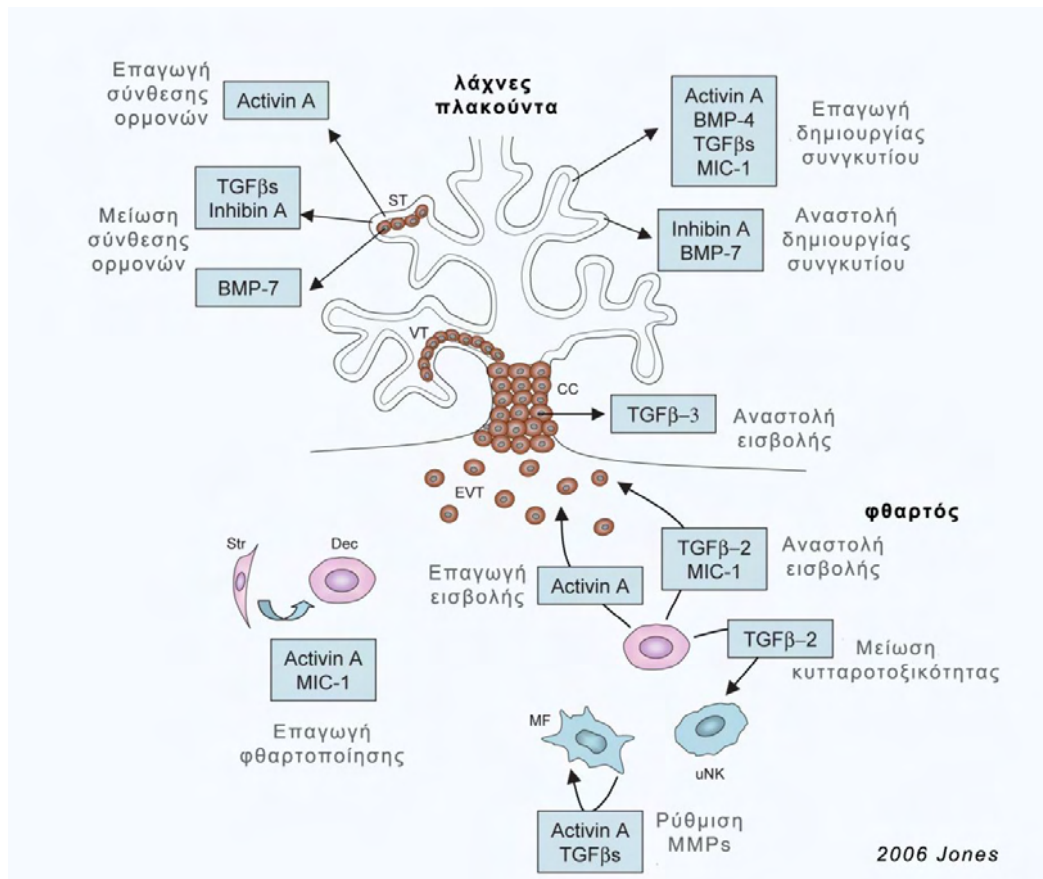
ενδέχεται να εμπλέκεται σε αυτή την ικανότητα των κυττάρων του στρώματος, τόσο με την επαγωγή των MMPs, όσο και με την επαγωγή της διεισδυτικής ικανότητας στα ESCs που έχει αναφερθεί από τους Ferreira, et.al. (2008), (Ferreira, et al. 2008; Gellersen, et al. 2010).

Επιπλέον, η ακτιβίνη A έχει δείχθει ότι μπορεί να επηρεάζει τον εμβryo-μητρικό διάλογο κατά τις φάσεις της επικάθισης και προσκόλλησης της τροφοβλάστης, μεταβάλλοντας την έκφραση της κυτταροκίνης LIF (leukemia inhibitory factor) στα κύτταρα του επιθηλίου του ενδομητρίου, καθώς *in vitro* δεδομένα έχουν αναφέρει ότι η εξωγενής προσθήκη ακτιβίνης A αύξησε την έκφραση του LIF (Florio, et al. 2010b; Jones, et al. 2006c).

#### Ρύθμιση ανάπτυξης και λειτουργίας πλακούντα

Η ακτιβίνη A έχει βρεθεί να εκφράζεται σε μεγάλη ποσότητα από κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης (STB) και μπορεί να ανιχνευτεί, όπως και η ινχιμπίνη A, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* σε κύτταρα που μόλις έχουν συγχωνευτεί (Jones, et al. 2006c). Τα παραπάνω δεδομένα, σε συνδυασμό με την ταυτόχρονη έκφραση της δεσμευτικής φολλιστατίνης στα κύτταρα τόσο της συγκυτιοτροφοβλάστης όσο και της κυτταροτροφοβλάστης, καθώς και της έκφρασης της ινχιμπίνης A και του ψευδο-υποδοχέα της βήτα γλυκάνης στην συγκυτιοτροφοβλάστη (Ji, et al. 2013; Jones, et al. 2006c), μαρτυρούν ότι ενδεχομένως η ακτιβίνη A να παίρνει μέρος υπό αυστηρή ρύθμιση κατά την συγχώνευση των κυττάρων της κυτταροτροφοβλάστης CTB και τη δημιουργία του συγκυτίου STB.

Η ακτιβίνη A έχει αναφερθεί επίσης να επηρεάζει θετικά τη στεροειδογένεση στον πλακούντα (STB) επάγοντας την έκκριση προγεστερόνης (P4) και οιστραδιόλης (E2), καθώς και να αυξάνει την παραγωγή άλλων ορμονών, όπως η χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG) και το πλακουντιακό γαλακτογόνο (hPL). Στην επαγωγή των ορμονών αυτών δρα ανασταλτικά ο TGFβ (hCG, hPL, P4, E2) καθώς και η ινχιμπίνη A (hCG, P4, E2). **Εικόνα 18** (Jones, et al. 2006c). Περαιτέρω ενδεχόμενοι ρόλοι της ακτιβίνης A και της ινχιμπίνης A κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης υποδεικνύονται από την αύξηση των πρωτεϊνών αυτών στη μητρική κυκλοφορία, όπου και οι δύο αυξάνουν όσο εξελίσσεται η κύηση με τα μεγαλύτερα επίπεδά τους να σημειώνονται, όπως έχει ήδη αναφερθεί, κατά το τρίτο τρίμηνο (Jones, et al. 2006c).



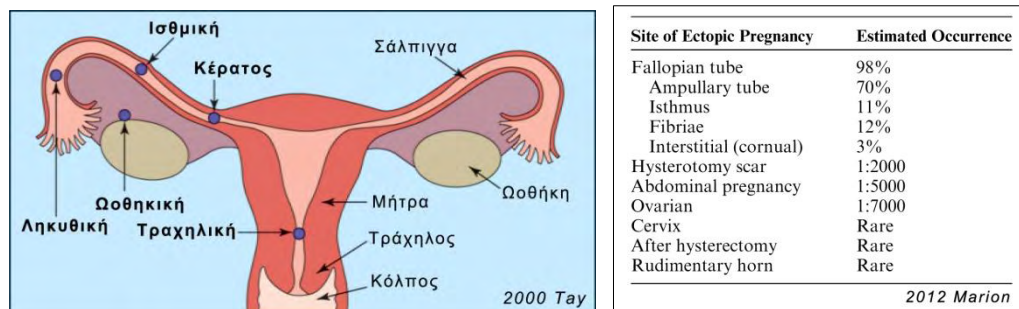
**Εικόνα 18 :** Σύνοψη προτεινόμενων δράσεων των μελών της υπερ-οικογένειας του TGFβ στο επίπεδο της εμβρυο-μητρικής αλληλεπίδρασης κατά την εγκαθίδρυση της εγκυμοσύνης. Ένας μεγάλος αριθμός των μελών της υπερ-οικογένειας του TGFβ εκφράζεται από τις λάχνες του πλακούντα, είτε μόνο από την συγκυτιοτροφοβλάστη (ST), είτε από το εσωτερικό στρώμα της λαχνικής κυτταροτροφοβλάστης (VT). Οι παράγοντες αυτοί έχει δείχθει να επηρεάζουν την παραγωγή ορμονών (οιστρογόνα, προγεστερόνη, πλακουντιακό γαλακτογόνο) καθώς είτε/και τη δημιουργία του συγκυτίου. Η ακτιβίνη A και η κυτοκίνη MIC-1 (macrophage inhibitory cytokine) παράγονται επίσης από το φθαρτό και επάγουν τη διαφοροποίηση των κυττάρων του στρώματος (Str) σε φθαρτοποιημένα κύτταρα (Dec). Οι δύο παράγοντες αυτοί μαζί με τον TGFβ2, παίρνουν μέρος στην ρύθμιση της εισβολής της εξωλαχνικής τροφοβλάστης, ενώ παράλληλα τα υπό διαφοροποίηση κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα της κυτταρικής κολώνας (CC) παράγουν TGFβ3, ο οποίος αναστέλλει την εισβολή. Ο TGFβ του φθαρτού προτείνεται ότι δρα μειώνοντας την κυτταροτοξικότητα των NK κυττάρων, οδηγώντας στον μητρικού τύπου ειδικό φαινότυπό τους (uNK). Ιστικά μακροφάγα (MF) στο σημείο της εμφύτευσης καθώς και στο μη φθαρτοποιημένο ενδομήτριο, παράγουν μία πλειάδα κυτοκινών, μεταξύ των οποίων ο TGFβ κι οι ακτιβίνες, με αντίρροπες δράσεις που ρυθμίζουν την έκφραση και τη δραστηριότητα των μεταλλοπρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας (MMPs). (Jones, et al. 2006c).

## Μέρος Γ

### Εξωμήτρια και παλίνδρομη κύηση

Γυναίκες που εμφανίζουν την τριάδα συμπτωμάτων, κοιλιακός πόνος, κολπική αιμορραγία και απουσία εμμήνου ρύσεως, δημιουργούν την υποψία για την παρουσία εξωμήτριου (ΕΚ), παλίνδρομης (ΠΚ) ή φυσιολογικής ενδομήτριας κύησης (φΕΜΚ) (Kirk, et al. 2014; Shaw, et al. 2012).

Ως έκτοπη ή εξωμήτρια (ectopic/extra uterine pregnancy EP, *eccysis*) ορίζεται η κύηση στην οποία η εμφύτευση της αναπτυσσόμενης βλαστοκύστης πραγματοποιείται σε τοποθεσία διαφορετική από αυτήν της ενδομήτριας κοιλότητας. Στις περισσότερες περιπτώσεις (93-98%, (Kirk, et al. 2014; Marion and Meeks 2012), η εμφύτευση πραγματοποιείται στις σάλπιγγες, με την ληκυθική περιοχή να κυριαρχεί (ampullary EP) (70-75%, (Kirk, et al. 2014; Marion and Meeks 2012) έναντι των περιοχών του ισθμού (isthmic EP) (11-13%, (Kirk, et al. 2014; Marion and Meeks 2012), του κώδωνα (fimbriae EP) (12%, (Marion and Meeks 2012) και του διάμεσου (interstitial/corneal EP) (2-3% (Marion and Meeks 2012; Rana, et al. 2013; Warda, et al. 2014). Λιγότερο συχνά σημεία εμφύτευσης αποτελούν οι τομές καισαρικής επέμβασης (cesarean scar EP), η κοιλιακή κοιλότητα (abdominal EP) και οι ωθήκες (ovarian EP), ενώ εξαιρετικά σπάνια η εξωμήτριος κύηση εμφανίζεται στον τράχηλο (cervical EP) (Marion and Meeks 2012) ή στο τοίχωμα του μυομητρίου (intramural) (Kirk, et al. 2013), **Εικόνα 19** (Tay, et al. 2000) και **Πινάκας 2** (Marion and Meeks 2012). Μία ιδιαίτερη κατηγορία αποτελεί η χρόνια ΕΚ, στην οποία παρατηρείται σταδιακή αποδόμηση του τοιχώματος των σαλπίγγων που συνοδεύεται από επαναλαμβανόμενα επεισόδια αιμορραγίας, οδηγώντας στη δημιουργία μάζας (Di Spiezio Sardo, et al. 2004; Dighe, et al. 2008), καθώς και η ετερότοπος κύηση (heterotopic) η οποία περιγράφει την ταυτόχρονη παρουσία δύο κυήσεων, μίας έκτοπης και μίας φυσιολογικής ενδομήτριας (Kirk, et al. 2014; Rana, et al. 2013).



**Εικόνα 19:** Σημεία εμφύτευσης έκτοπης τροφοβλάστης (Tay, et al. 2000).

**Πινάκας 2 :** Σημεία έκτοπης κύησης και αντίστοιχη συχνότητα εμφάνισης (Marion and Meeks 2012).

Η έκτοπος κύηση συνιστά ένα επείγον περιστατικό που χρήζει άμεσης ιατρικής παρακολούθησης, καθώς υπάρχει το ενδεχόμενο της ρήξης του ιστού που φιλοξενεί το κύημα και της επακόλουθης εσωτερικής αιμορραγίας (Marion and Meeks 2012). Συνοδεύεται δε από υψηλά ποσοστά θνησιμότητας και νοσηρότητας (Marion and Meeks 2012), συμμετέχοντας στο 75% των θανάτων που εμφανίζονται κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου και στο 9% όλων των συμβάντων θανάτου που σχετίζονται με την κύηση (Rana, et al. 2013), καθώς και με επακόλουθη (ή προϋπάρχουσα) μειωμένη γονιμότητα (Rana, et al. 2013; Sivalingam, et al. 2011). Από τις κατηγορίες των έκτοπων κυήσεων, η μη σαλπιγγικής προέλευσης θεωρείται ως η πλέον επικίνδυνη, λόγω της ανατομικής θέσης της κύησης (Kirk and Bourne 2011). Παρόλα αυτά, εξαιρετικά σπάνια έχουν αναφερθεί τελειόμηνες εξωμήτριες κυήσεις με ζώντα νεογνά (ΕΚ κοιλιακής χώρας, (Brasso and Strom 1991; Brewster, et al. 2011; Zhang, et al.



2008), ΕΚ ωοθηκική, (Lee, et al. 2014), οι οποίες ωστόσο συνοδεύονται από περιγεννητικές επιπλοκές και νεογνική θνησιμότητα (Marion and Meeks 2012).

Η συχνότητα εμφάνισης της έκτοπης κύησης είναι δύσκολο να εκτιμηθεί, καθώς μπορεί να αντιμετωπιστεί και σε εξω-νοσοκομειακό περιβάλλον, ωστόσο υπολογίζεται ότι κυμαίνεται γύρω στο 1-2% όλων των αναγνωρισμένων κυήσεων, (Marion and Meeks 2012; Sivalingam, et al. 2011), ενώ έχουν αναφερθεί περαιτέρω και γεωγραφικές διακυμάνσεις, με τάση προς αύξηση ή μείωση της συχνότητας εμφάνισης ανάλογα με την υπό μελέτη χώρα (Rana, et al. 2013). Επιπλέον, η χρήση των τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής έχει συσχετιστεί με αυξημένη συχνότητα εμφάνισης (2-5%, (Brady, et al. 2014; Refaat, et al. 2015; Sivalingam, et al. 2011) των έκτοπων κυήσεων σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό, ιδίως στις περιπτώσεις των ετερότοπων κυήσεων όπου, η ταυτόχρονη παρουσία μίας φυσιολογικής ενδομήτριας κύησης μαζί με μία έκτοπη, εμφανίζεται πολύ σπάνια (1/30.000), ενώ η ίδια συχνότητα εμφάνισης στις γυναίκες που συμμετέχουν στα προγράμματα εξωσωματικής γονιμοποίησης ανέρχεται στις 1/100 (Kirk, et al. 2014; Oron and Tulandi 2013). Στον ίδιο πληθυσμό γυναικών, παρουσιάζονται επίσης με μεγαλύτερη συχνότητα και οι τραχηλικές καθώς και οι έκτοπες κυήσεις του διάμεσου τμήματος των σαλπίγγων (Marion and Meeks 2012). Η ωοθηκική διέγερση, η μεταφορά περισσότερων του ενός εμβρύου, η ποιότητα του εμβρύου καθώς και η τεχνική μεταφοράς, θεωρείται ότι μπορεί να εμπλέκονται στην παρατηρούμενη αυτή αύξηση της συχνότητας των έκτοπων κυήσεων, (Kirk, et al. 2014; Marion and Meeks 2012; Refaat, et al. 2015), με τις τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής να συγκαταλέγονται είτε στους χαμηλού ρίσκου, (Marion and Meeks 2012; Oron and Tulandi 2013), είτε στους υψηλού ρίσκου παράγοντες κινδύνου εκδήλωσης έκτοπης κύησης (Refaat, et al. 2015).

Risk factors for ectopic pregnancy		
Degree of risk	Risk factors	Odds ratio
High	Previous ectopic pregnancy	9.3–47
	Previous tubal surgery	6.0–11.5
	Tubal ligation	3.0–139
	Tubal pathology	3.5–25
	In utero DES exposure	2.4–13
	Current IUD use	1.1–45
Moderate	Infertility	1.1–28
	Previous cervicitis (gonorrhea, chlamydia)	2.8–3.7
	History of pelvic inflammatory disease	2.1–3.0
	Multiple sexual partners	1.4–4.8
	Smoking	2.3–3.9
Low	Previous pelvic/abdominal surgery	0.93–3.8
	Vaginal douching	1.1–3.1
	Early age of intercourse (<18 years)	1.1–2.5

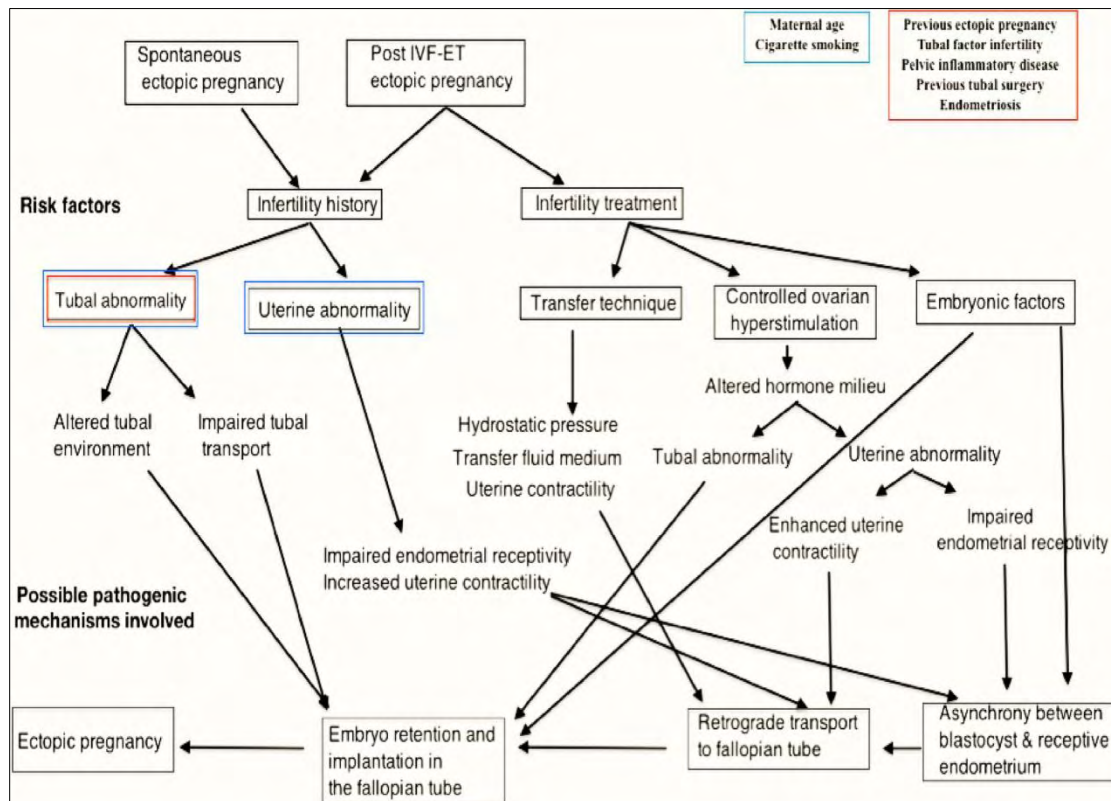
2013 Oron

Παράγοντες υψηλού κινδύνου εμφάνισης έκτοπης κύησης θεωρούνται το ιστορικό προηγούμενης έκτοπης κύησης, οι χειρουργικές επεμβάσεις στις σάλπιγγες, η στειροποίηση των σαλπίγγων, η παθολογική κατάσταση των σαλπίγγων (υδροσάλπιγγα, ενδομητρίωση) καθώς και η χρήση ενδομήτριων συσκευών αντισύλληψης, ενώ στους παράγοντες ενδιάμεσου κινδύνου συγκαταλέγονται η υπογονιμότητα, το κάπνισμα, καθώς και το ιστορικό φλεγμονώδους νόσου της πυέλου και σεξουαλικά μεταδιδόμενων νοσημάτων (Marion and Meeks 2012; Oron and Tulandi 2013; Refaat, et al. 2015; Shaw, et al. 2012). Άλλοι παράγοντες που μπορεί να

ενέχονται στη δημιουργία έκτοπων κυήσεων είναι η αυξημένη μητρική ηλικία (αύξηση πιθανότητας έκθεσης στους παράγοντες κινδύνου), η παθολογία της μήτρας (Refaat, et al. 2015) καθώς και γενετικοί πολυμορφισμοί (Shaw, et al. 2012). Ο λόγος πιθανοτήτων (odds ratio) για τους παράγοντες κινδύνου που επηρεάζουν τη δημιουργία των έκτοπων κυήσεων παρουσιάζεται στο **ένθετο** (Oron and Tulandi 2013). Αξίζει να σημειωθεί ωστόσο, ότι περίπου οι μισές γυναίκες που διαγιγνώσκονται με έκτοπο κύηση, δεν εμφανίζουν κανέναν από τους παραπάνω παράγοντες κινδύνου (Marion and Meeks 2012; Shaw, et al. 2012).

Αν και ο μηχανισμός που οδηγεί στη δημιουργία έκτοπης κύησης παραμένει αδιευκρίνιστος, καταστάσεις που καθυστερούν ή αποτρέπουν τη διάβαση του αναπτυσσόμενου εμβρύου μέσα από τις σάλπιγγες στην πορεία του για την ενδομήτρια κοιλότητα, μπορεί να οδηγούν

στην σαλπινγική εμφύτευση, (Marion and Meeks 2012; Sivalingam, et al. 2011) . Οι μηχανισμοί αυτοί ενδέχεται να περιλαμβάνουν την ανατομική παρεμπόδιση (διαβατότητα) των σαλπίγγων, ανωμαλίες της κινητικότητας των σαλπίγγων ή των βλεφαρίδων τους ανωμαλίες της μήτρας, ανωμαλίες του εμβρύου, καθώς και χημειοτακτικούς παράγοντες που ενισχύουν την εμφύτευση στις σάλπιγγες, (Marion and Meeks 2012; Refaat, et al. 2015; Shaw, et al. 2010). Μια σχηματική αναπαράσταση των ενδεχόμενων μηχανισμών που μπορεί να οδηγούν στη δημιουργία έκτοπης κύησης ,τόσο στις σποραδικά εμφανιζόμενες όσο και στις περιπτώσεις γυναικών μετά από εξωσωματική , καθώς και των παραγόντων κινδύνου που εμπλέκονται , παρουσιάζεται στην **εικόνα 20** (Refaat, et al. 2015).



**Εικόνα 20:** Πιθανοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην παθογένεια της σαλπινγικής κύησης μετά από φυσιολογική ή IVF πορεία σύλληψης, σε σχέση με καθιερωμένους παράγοντες κινδύνου (Refaat, et al. 2015).

Οι παλίνδρομες κύσεις (ΠΚ) (missed/delayed abortion/miscarriage) χαρακτηρίζονται ως ενδομήτριες κυήσεις, όπου χάνεται η καρδιακή λειτουργία ή/και η ανάπτυξη του εμβρύου, είτε υπάρχει ένας άδειος εμβρυϊκός σάκος μέχρι και την 12<sup>η</sup> εβδομάδα ανάπτυξης (Bottomley and Bourne 2009), αλλά η δραστηριότητα της μήτρας δεν οδηγεί στην αποβολή του κύηματος (Fang, et al. 2009). Οι παλίνδρομες κύσεις αποτελούν μία υποκατηγορία των αυτόματων (spontaneous abortion/miscarriage) αποβολών, οι οποίες περιλαμβάνουν επίσης τις επαπειλούμενες (threatened), αναπόφευκτες (inevitable), ατελείς (incomplete), και ολοκληρωμένες (complete) αποβολές (Bottomley and Bourne 2009; Dighe, et al. 2008; Graham, et al. 2015) (**χαρακτηριστικά στο ένθετο** (Graham, et al. 2015)), καθώς επίσης και τις κατ'έξιν (recurrent) αποβολές (Larsen, et al. 2013; Tang and Quenby 2010). Στην ορολογία περιγραφής των αποβολών όπως και στην υποκατηγοριοποίησή τους, συναντώνται επίσης και άλλοι όροι (όπως early pregnancy loss, early fetal demise, (Bottomley and Bourne 2009) και προσπάθεια συστήνεται από τις κατευθυντήριες οδηγίες της ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology), ώστε να δημιουργηθεί μία κοινή γραμμή περιγραφής των περιστατικών αυτών (Kolte, et al. 2015).



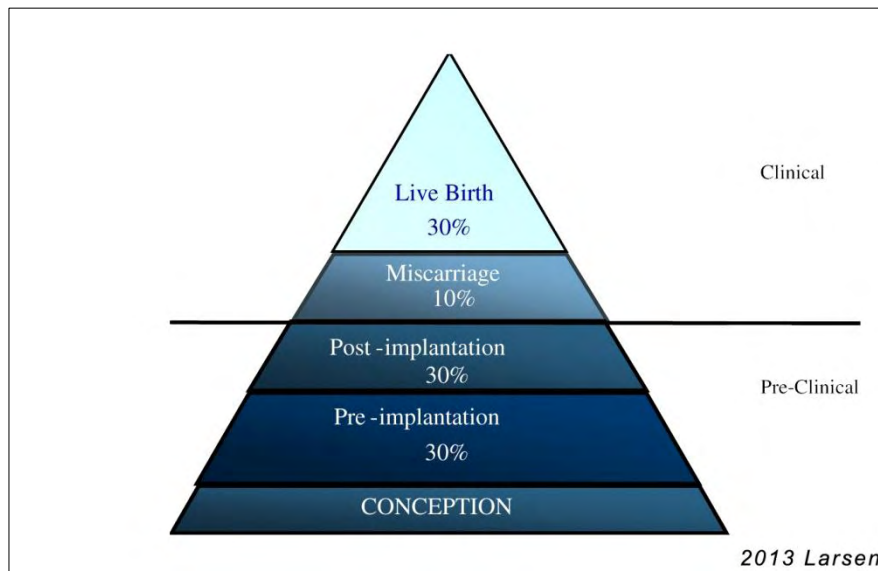
**WHO classification of the stages of spontaneous miscarriage**

Threatened miscarriage	A threat of miscarriage that exists when unprovoked vaginal bleeding, with or without lower abdominal pain, occurs in a pregnancy of <22 weeks' gestation (pregnancy may continue).
Inevitable miscarriage	A miscarriage deemed inevitable when specific clinical features indicate that a pregnancy is in the process of physiological expulsion from within the uterine cavity (pregnancy will not continue and will proceed to incomplete or complete miscarriage).
Incomplete miscarriage	A miscarriage in which early pregnancy tissue is partially expelled. It is possible that many incomplete miscarriages are unrecognised missed miscarriages.
Complete miscarriage	A miscarriage in which early pregnancy tissue is completely expelled.
Missed miscarriage	A miscarriage with ultrasound features consistent with a non-viable or non-continuing pregnancy, even in the absence of clinical features. Early pregnancy tissue may be partially expelled. Missed miscarriage is usually an incidental finding because there is rarely any indication that anything was wrong with the pregnancy. Some women do recall a transient and/or brownish vaginal discharge, or a vague reduction in symptoms of early pregnancy.

2014 Graham

Οι αποβολές αποτελούν την πιο συχνή αιτία επιπλοκών της εγκυμοσύνης, χωρίς ωστόσο να συνοδεύονται από σοβαρή νοσηρότητα ή θνησιμότητα (Bottomley and Bourne 2009) και διαχωρίζονται περαιτέρω σε αποβολές πρώτου (μέχρι τη 12<sup>η</sup> εβδομάδα ανάπτυξης, early pregnancy loss/ miscarriage) και δευτέρου τριμήνου (μέχρι την 24<sup>η</sup> εβδομάδα ανάπτυξης, late pregnancy loss/ miscarriage) (Bottomley and Bourne 2009; Larsen, et al. 2013). Από τις αρχόμενες κύσεις, έχει υπολογιστεί ότι ένα μεγάλο ποσοστό της τάξης του 60% καταλήγει σε απώλεια της εγκυμοσύνης στο στάδιο πριν ή μετά την εμφύτευση του εμβρύου (προκλινικές κύσεις), ένα 10% οδηγεί σε αποβολή (κλινική κύηση) και μόλις το 30% των αρχόμενων κύσεων οδηγεί τελικά στη γένεση ζώντος νεογνού (Larsen, et al. 2013), **Εικόνα 21** (Larsen, et al. 2013). Παρόλα αυτά η

συχνότητα εμφάνισης των αποβολών είναι δύσκολο να προσδιοριστεί καθώς ένας μεγάλος αριθμός των περιπτώσεων αυτών αντιμετωπίζεται σε εξω-νοσοκομειακό περιβάλλον, ενώ ταυτόχρονα είναι άγνωστος ο αριθμός των γυναικών που δεν λαμβάνουν ιατρική περίθαλψη (Bottomley and Bourne 2009). Περαιτέρω, το ποσοστό απώλειας μιας αρχόμενης κλινικής κύησης παρουσιάζει διακυμάνσεις ανάλογα με την ηλικία, με χαμηλά ποσοστά (10%) να εμφανίζονται σε γυναίκες ηλικίας 20-24 ετών και υψηλά ποσοστά (51%) σε γυναίκες ηλικίας 40-44 ετών (Larsen, et al. 2013). Η παλίνδρομος κύηση συχνά δε συνοδεύεται από συμπτώματα και ανευρίσκεται κατά τον έλεγχο ρουτίνας κατά το πρώτο τρίμηνο με συχνότητα εμφάνισης 3% (Bottomley and Bourne 2009; Sur and Raine-Fenning 2009).



2013 Larsen

**Εικόνα 21:** Πυραμидική αναπαράσταση του αποτελέσματος μίας σύλληψης. Υπολογίζεται ότι 70% των συλλήψεων χάνεται πριν τη γέννηση. Η πλειονότητα αυτών των απωλειών εμφανίζεται πριν την εμφύτευση είτε πριν την απουσία της έμμηνου ρύσεως και καθώς δεν αποκαλύπτονται στην γυναίκα, ονομάζονται προκλινικές κύσεις (Larsen, et al. 2013).

Μια πλειάδα παραγόντων μπορεί να ενέχεται στην εμφάνιση της παλίνδρομης κύησης, μεταξύ των οποίων οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες του εμβρύου (κυρίως τρισωμίες 16, 21,22) ανιχνεύονται σε μεγάλο ποσοστό (70%) στις αποβολές πρώτου τριμήνου (Bottomley and Bourne 2009). Από την πλευρά της μητέρας, οι συγγενείς ή επίκτητες (σύνδρομο Asherman) ανατομικές ανωμαλίες της μήτρας, οι διαταραχές του ανοσοποιητικού (αντιφωσφολιπιδιακό σύνδρομο, αντιθρομβωτικά αντισώματα, συγγενής ή επίκτητη θρομβοφιλία, ισορροπία κυτοκινών ενδομητρίου) ή του ενδοκρινολογικού συστήματος (σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, υπερπρολακτιναιμία, ανεπάρκεια ωχρινικής φάσης), καθώς και η παρουσία γενετικών πολυμορφισμών έχουν εμπλακεί στην απώλεια της αρχόμενης κύησης (Bottomley and Bourne 2009; Dighe, et al. 2008; Fang, et al. 2009; Larsen, et al. 2013; Tang and Quenby 2010).

Άλλοι παράγοντες που ενδέχεται να εμπλέκονται στις αποβολές είναι επίσης η μητρική παχυσαρκία, η κατανάλωση αλκοόλ και καφεΐνης, το κάπνισμα, η έκθεση σε στρεσογόνους παράγοντες καθώς και οι λοιμώξεις του ουρογεννητικού συστήματος (Brunton 2013; Horne and Alexander 2005; Larsen, et al. 2013), ενώ από την πλευρά του πατέρα έχει ενοχοποιηθεί ο κατακερματισμός (fragmentation) και η ζημία (damage) του DNA του σπέρματος (Larsen, et al. 2013) καθώς και η αυξημένη ηλικία (Oliver and Overton 2014). Ο σημαντικότερος ωστόσο παράγοντας πρόβλεψης που συσχετίζεται με τις αποβολές είναι η μεγάλη ηλικία της μητέρας (Bottomley and Bourne 2009; Graham, et al. 2015) καθώς και το προηγούμενο ιστορικό αποβολών (Bottomley and Bourne 2009). Αξίζει να σημειωθεί ότι όπως και στην περίπτωση των έκτοπων κυήσεων, περίπου 50% των γυναικών που αποβάλουν δεν εμφανίζουν κανέναν από τους παραπάνω παράγοντες κινδύνου (Horne and Alexander 2005).

Αν και η πολυπαραγοντική φύση των αποβολών δεν επιτρέπει έναν ενιαίο μηχανισμό εξήγησης της δημιουργίας της κατάστασης αυτής, ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι τα φθαρτοποιημένα κύτταρα του στρώματος του ενδομητρίου μπορούν να λειτουργήσουν ως ένας ανιχνευτής σημάτων του εμβρύου, επιλέγοντας προς εμφύτευση έμβρυα καλής ποιότητας. Στο πλαίσιο της παρατήρησης αυτής, γυναίκες που παρουσιάζουν αποβολές ενδέχεται να έχουν ένα διαταραγμένο ενδομήτριο, το οποίο να επιτρέπει την εμφύτευση εμβρύων κακής ποιότητας, η οποία εμφύτευση να έχει ως αποτέλεσμα η επακόλουθη απώλεια της εγκυμοσύνης να παρατηρείται αργότερα στο στάδιο της κλινικής κύησης, αντί για νωρίτερα στο στάδιο της προκλινικής κύησης (Larsen, et al. 2013). Περαιτέρω, ένα διαταραγμένο «υπερ-υποδεκτικό» ενδομήτριο μπορεί να οδηγήσει στην «εκτός φάσης» εμφύτευση ενός καθόλα υγιούς εμβρύου (ενδομήτριο υποδεκτικό για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από το σύνηθες «παράθυρο εμφύτευσης»-ημέρα LH+7 μέχρι ημέρα LH+11), υπονομεύοντας την ανάπτυξη του εμβρύου και οδηγώντας σε απώλεια της εγκυμοσύνης (Achache and Revel 2006; Weimar, et al. 2013).

### Διάγνωση

Η τριάδα συμπτωμάτων που αναφέρθηκε (κοιλιακός πόνος, κολπική αιμόρροια, απουσία εμμήνου ρύσεως) δεν είναι ειδική για τη διευκρίνιση της παρουσίας μίας έκτοπης ή παλίνδρομης κύησης, καθώς τα συμπτώματα αυτά μπορούν να εμφανιστούν επίσης σε μία φυσιολογική ενδομήτρια κύηση (Barnhart, et al. 2011; Bottomley and Bourne 2009), ενώ ταυτόχρονα οι έκτοπες κυήσεις μπορούν να μιμηθούν τα συμπτώματα άλλων διαταραχών του γυναικολογικού, γαστρεντερικού και ουροποιητικού συστήματος (όπως σαλπινγίτιδα, ρήξη ωχρού σωματίου και ωοθηκικών κύστεων, επαπειλούμενη ή αναπόφευκτη αποβολή, συστροφή ωοθηκών, λοίμωξη του ουροποιητικού)(Kirk, et al. 2014; Sivalingam, et al. 2011) και περαιτέρω ένα 10% των γυναικών με έκτοπη κύηση δεν εμφανίζουν καθόλου συμπτώματα (Kirk, et al. 2014). Ωστόσο, η παρουσία οποιουδήποτε από τα παραπάνω συμπτώματα σε μία γυναίκα αναπαραγωγικής ηλικίας, οφείλει να εγείρει την υποψία της

παρουσίας κύησης, στη διαφοροδιάγνωση της οποίας πρέπει να συμπεριλαμβάνεται και η έκτοπη κύηση (Oron and Tulandi 2013; Sivalingam, et al. 2011), όπως αναδεικνύει το γεγονός ότι γυναίκες που κατέληξαν μετά από ρήξη εξωμήτριου κύησης, είχαν λάβει λανθασμένη αρχική διάγνωση (Sivalingam, et al. 2011).

Το ιστορικό, η γυναικολογική εξέταση, η χρήση διακολπικού υπέρηχου (TVUS, transvaginal ultrasound), καθώς και η μέτρηση των επιπέδων της χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG) αποτελούν χρήσιμα εργαλεία για τη διάγνωση τόσο των εξωμήτριων όσο και των παλίνδρομων κυήσεων, (Bottomley and Bourne 2009; Shaw, et al. 2012). Ωστόσο στις περισσότερες περιπτώσεις, με την εξαίρεση των διαρραγέντων εξωμήτριων, η διάγνωση της εξωμήτριου κύησης τίθεται εξ αποκλεισμού, και η επιβεβαίωση της διάγνωσης στις περιπτώσεις αυτές γίνεται μόνον μετά από τη λαπαροσκοπική αφαίρεση του κυήματος και της επακόλουθης ιστολογικής του εξέτασης (Shaw, et al. 2012), όπως και σε αρκετές περιπτώσεις παλίνδρομων κυήσεων όπου η τελική επιβεβαίωση της διάγνωσης γίνεται μόνον μετά από την ιστολογική εξέταση της απόξεσης ή αναρρόφησης του κυήματος (Seeber 2012).

Η χρήση του διακολπικού υπέρηχου συνετέλεσε σημαντικά στην αύξηση της ευκρίνειας της απεικόνισης των αρχόμενων κυήσεων, με την ανίχνευση του σάκου κύησης σε μία φυσιολογική ενδομήτρια κύηση να απεικονίζεται γύρω στις 5 εβδομάδες κύησης, ακολουθούμενη από την απεικόνιση του λεκιθικού σάκου στις 5<sub>1/2</sub> εβδομάδες και την απεικόνιση της παρουσίας του εμβρύου γύρω στις 6 εβδομάδες κύησης (Doubilet, et al. 2013). Ωστόσο, καθώς σε πολλές περιπτώσεις είναι άγνωστη η συγκεκριμένη εβδομάδα κύησης ( με βάση τη μαρτυρία της γυναίκας για την τελευταία περίοδό της), ενώ ταυτόχρονα παρατηρούνται διακυμάνσεις τόσο στην ανάπτυξη των κυήσεων κατά το πρώτο τρίμηνο (άρα και στην παρουσία συγκεκριμένων υπερηχογραφικών ενδείξεων, οροσήμενων των εβδομάδων ανάπτυξης ) όσο και στην ικανότητα μετρήσεων με ακρίβεια ανάλογα με το άτομο-χειριστή του υπερήχου, είναι δυνατόν είτε οι ενδομήτριες κυήσεις να είναι πολύ μικρές σε μέγεθος ώστε να μπορούν να απεικονιστούν (ο σάκος κύησης δεν έχει αναπτυχθεί, είτε έχει καταρρεύσει), είτε οι υπερηχογραφικές ενδείξεις να μην επιτρέπουν μια οριστική διάγνωση κατά τη διαφοροδιάγνωση ΕΚ από φΕΜΚ, ΕΚ από ΠΚ, ή ετερότοπου κύησης (Bottomley and Bourne 2009; Levine 2014; Nisenblat, et al. 2005; Refaat, et al. 2015; Shaw, et al. 2012; Wang, et al. 2014).

Τα παραπάνω δεδομένα γίνονται περισσότερο εμφανή από την παρατήρηση ότι περισσότερο από 50% των γυναικών με εξωμήτρια κύηση δεν διαγιγνώσκονται με ΕΚ κατά την πρώτη τους επίσκεψη (Shaw, et al. 2012) καθώς και από το γεγονός ότι η υπερηχογραφική απεικόνιση παραμένει ασαφής σε ένα 20% (μέχρι και 50%, (Barnhart 2009) των γυναικών αυτών, με αποτέλεσμα να κατατάσσονται στις κυήσεις αγνώστου θέσεως (PUL, pregnancy of unknown location), (Rubal and Chung 2012; Shaw, et al. 2012). Με βάση τα παραπάνω, ο διακολπικός υπέρηχος μπορεί να συμβάλει στη διάγνωση μιας εξωμήτριας κύησης μόνον όταν υπάρχουν θετικές ενδείξεις της παρουσίας μιας εξωμήτριας κύησης (εξωμήτριος σάκος κύησης με ή χωρίς έμβρυο) και όχι όταν οι ενδείξεις αυτές απουσιάζουν (απουσία ενδομήτριας κύησης) (Kirk and Bourne 2011; Rana, et al. 2013; Richardson, et al. 2015; Sivalingam, et al. 2011). Επιπλέον, η διάγνωση των εξωμήτριων κυήσεων περιπλέκεται από το γεγονός ότι η θετική απεικόνιση μιας ενδομήτριας κύησης δεν αποκλείει την ταυτόχρονη παρουσία μιας εξωμήτριου κύησης (ετερότοπος κύηση) (Kirk, et al. 2014; Refaat, et al. 2015; Sivalingam, et al. 2011; Wang, et al. 2014)( παρουσίαση προτεινόμενου αλγορίθμου για τον εντοπισμό ετερότοπων κυήσεων (Cookingham, et al. 2015)).

Αντίστοιχα, κατευθυντήριες οδηγίες περιγράφουν τα συγκεκριμένα υπερηχογραφικά χαρακτηριστικά που πρέπει να ενυπάρχουν ώστε μία αρχόμενη κύηση να μπορεί να διαγνωστεί ως αποβολή (μέση διάμετρος σάκου κύησης MSD >25mm και απουσία εμβρύου ή

λεκιθικού σάκου, κεφαλοουριαίο μήκος  $CRL > 7mm$  και απουσία καρδιακής λειτουργίας, (Bourne and Bottomley 2012; Levine 2014), ωστόσο οι διακυμάνσεις που έχουν αναφερθεί παραπάνω (σε σχέση με την πορεία ανάπτυξης μιας φυσιολογικής ενδομήτριας κύησης όσο και με την ικανότητα μετρήσεων με ακρίβεια), πολλές φορές δεν επιτρέπουν μία οριστική διάγνωση κατά την αρχική επίσκεψη της γυναίκας, με αποτέλεσμα και οι ενδεχόμενες παλίνδρομες κυήσεις του πρώτου τριμήνου να κατατάσσονται συνήθως στην κατηγορία των κυήσεων αγνώστου θέσης (PUL), εκτός εάν υπάρχει θετική απεικόνιση παρουσίας ενδομήτριας κύησης (Barnhart, et al. 2011; Reid and Condous 2012). Τα παραπάνω δεδομένα καταδεικνύουν ότι η χρήση του διακολπικού υπερήχου κατά την αρχόμενη κύηση ενδέχεται να μην καταφέρει να παρέχει τις κατάλληλες πληροφορίες που απαιτούνται για τον διαχωρισμό μίας φυσιολογικής ενδομήτριας κύησης από μία εξωμήτρια ή από μία παλίνδρομη κύηση, με αποτέλεσμα να είναι απαραίτητα και επιπλέον δεδομένα για την κύηση ώστε να εξαχθεί ένα ασφαλές συμπέρασμα.

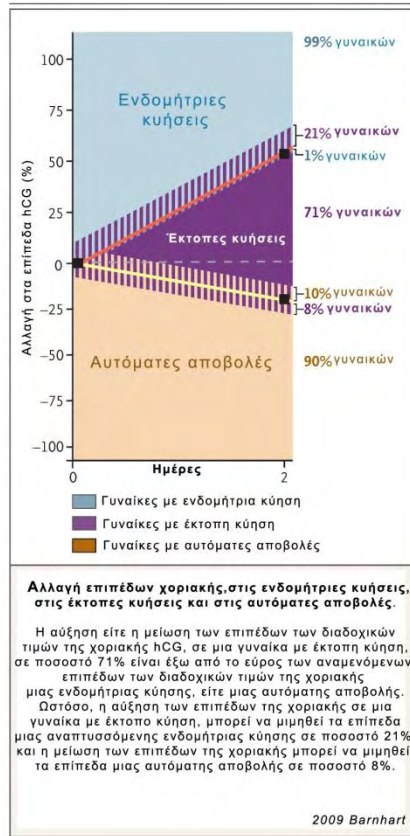
Τα επιπλέον δεδομένα αυτά προέρχονται από την μέτρηση των επιπέδων της χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG), η οποία παράγεται από το αναπτυσσόμενο έμβρυο και λειτουργεί ως ένας δείκτης-υποκατάστατο της εβδομάδας κύησης (Barnhart 2009). Όταν η τιμή της χοριακής βρίσκεται μεταξύ των 1500-2000 mIU/mL (διαχωριστική ζώνη) (Seeber 2012), σε μία φυσιολογική κύηση αυτό αντιστοιχεί περίπου στην 4<sub>1/2</sub>-5η εβδομάδα ανάπτυξης, όπου η παρουσία του σάκου κύησης αναμένεται να απεικονίζεται υπερηχογραφικά (TVUS) (Oron and Tulandi 2013). Όταν η εβδομάδα κύησης είναι σαφώς προσδιορισμένη (όπως συμβαίνει στην πορεία της εξωσωματικής γονιμοποίησης) και υπάρχουν σαφείς υπερηχογραφικές ενδείξεις (τοποθεσία κύησης γνωστή), τότε τιμές χαμηλότερες των <1500 mIU/mL υποδηλώνουν είτε εκδράμους (μη βιώσιμες) κυήσεις (EMK είτε ΕΚ), είτε EMK με καθυστερημένη ανάπτυξη και τιμές >2000 mIU/mL συνήθως συνάδουν με μία αναπτυσσόμενη ενδομήτρια κύηση (χωρίς ωστόσο να αποκλείεται η ετερότοπος κύηση και στις δύο περιπτώσεις) (Kirk, et al. 2014; Refaat, et al. 2015; Seeber 2012).

Παρόλα αυτά, καθώς υπάρχει διακύμανση στις μετρούμενες τιμές της χοριακής ανάλογα με τα αντιδραστήρια καθώς και η πιθανότητα εργαστηριακού λάθους, μία και μοναδική τιμή της χοριακής δεν είναι διαγνωστική (Oron and Tulandi 2013). Επιπλέον, η εβδομάδα κύησης δεν είναι επακριβώς προσδιορισμένη στις περισσότερες γυναίκες και καθώς υπάρχουν επίσης διακυμάνσεις στην ανάπτυξη των κυήσεων (άρα και στα επίπεδα της χοριακής ανάλογα με την εβδομάδα κύησης) (Bottomley and Bourne 2009), η απουσία του σάκου κύησης υπερηχογραφικά, όταν οι τιμές της χοριακής βρίσκονται στη διαχωριστική ζώνη, ενδέχεται να οφείλεται είτε στην παρουσία μιας αρχόμενης ενδομήτριας κύησης σε μικρότερη εβδομάδα ανάπτυξης /ή με καθυστερημένη ανάπτυξη, είτε στην παρουσία μιας παλίνδρομου ή έκτοπης κύησης (Refaat, et al. 2015). Για τον λόγο που αναφέρθηκαν παραπάνω καθώς και με βάση το γεγονός ότι σε μία φυσιολογική αρχόμενη EMK τα επίπεδα της χοριακής διπλασιάζονται κάθε δύο ημέρες (Oron and Tulandi 2013), πραγματοποιούνται για να συνεπικουρήσουν στη διάγνωση διαδοχικές μετρήσεις της χοριακής κάθε 48 ώρες, ώστε να προσδιοριστεί η αναλογία διπλασιασμού της (Seeber 2012).

Βιώσιμες αναπτυσσόμενες ενδομήτριες κυήσεις εμφανίζουν αναλογία διπλασιασμού της χοριακής (μέτρηση μετά από 48 ώρες/αρχική μέτρηση 0 ώρες) >1.66 δηλαδή αύξηση >66% κάθε δύο μέρες (με διάστημα εμπιστοσύνης 85%). Καθώς όμως περίπου 8% των βιώσιμων κυήσεων παρατηρήθηκε να εμφανίζουν πιο αργή αύξηση, προτάθηκε αργότερα ένα μεγαλύτερο διάστημα εμπιστοσύνης (99%) το οποίο αντιστοιχεί σε αύξηση >53% κάθε δύο μέρες (όπου αναμένεται μόνον 1% των βιώσιμων κυήσεων να παρουσιάζει χαμηλότερη αύξηση) (Barnhart 2009; Seeber 2012). Αντίστοιχα, οι μη βιώσιμες κυήσεις εμφανίζουν μειωμένη αναλογία διπλασιασμού της χοριακής 48ώρου, η οποία είναι της τάξης του <0.87 (μέτρηση μετά από 48 ώρες/αρχική μέτρηση 0 ώρες), δηλαδή μείωση της χοριακής >13%

κάθε δύο μέρες (με 95% διάστημα εμπιστοσύνης) (Condous, et al. 2006; Seeber 2012). Επιπλέον, η αναλογία αυτή διπλασιασμού της χοριακής μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε πολύδυμες κύσεις καθώς παρουσιάζει παρόμοια εικόνα και μόνον οι απόλυτες τιμές της χοριακής είναι υψηλότερες στις πολύδυμες κύσεις (Barnhart 2009; Seeber 2012).

Ωστόσο τόσο η αύξηση όσο και η μείωση της αναλογίας διπλασιασμού της χοριακής, μπορεί να συνοδεύεται από μία έκτοπη κύηση (Barnhart 2009; Seeber 2012). Ανάλογα με την λειτουργία της έκτοπης τροφοβλάστης, μία έκτοπη κύηση μπορεί να παρουσιάζει αύξηση



στον διπλασιασμό της χοριακής σε 50% των περιπτώσεων, είτε να παρουσιάζει μείωση στο υπόλοιπο 50% των περιπτώσεων. Έτσι ένα ποσοστό 21% των έκτοπων κύσεων παρουσιάζει αύξηση της χοριακής 48ώρου που μιμείται τα κατώτερα όρια αύξησης των ενδομήτριων κύσεων και ένα 8% των έκτοπων κύσεων παρουσιάζει μείωση που μιμείται τα ανώτερα επίπεδα μείωσης της χοριακής που παρατηρούνται στις αποβολές. Ωστόσο η πλειονότητα των γυναικών (71%) με έκτοπη κύηση παρουσιάζει αναλογία αύξησης της χοριακής μικρότερη από αυτή των EMK και μείωση των επιπέδων της χοριακής πιο αργή σε σχέση με τις εκδράμους κύσεις (Barnhart 2009), (**Ενθετο** (Barnhart 2009)).

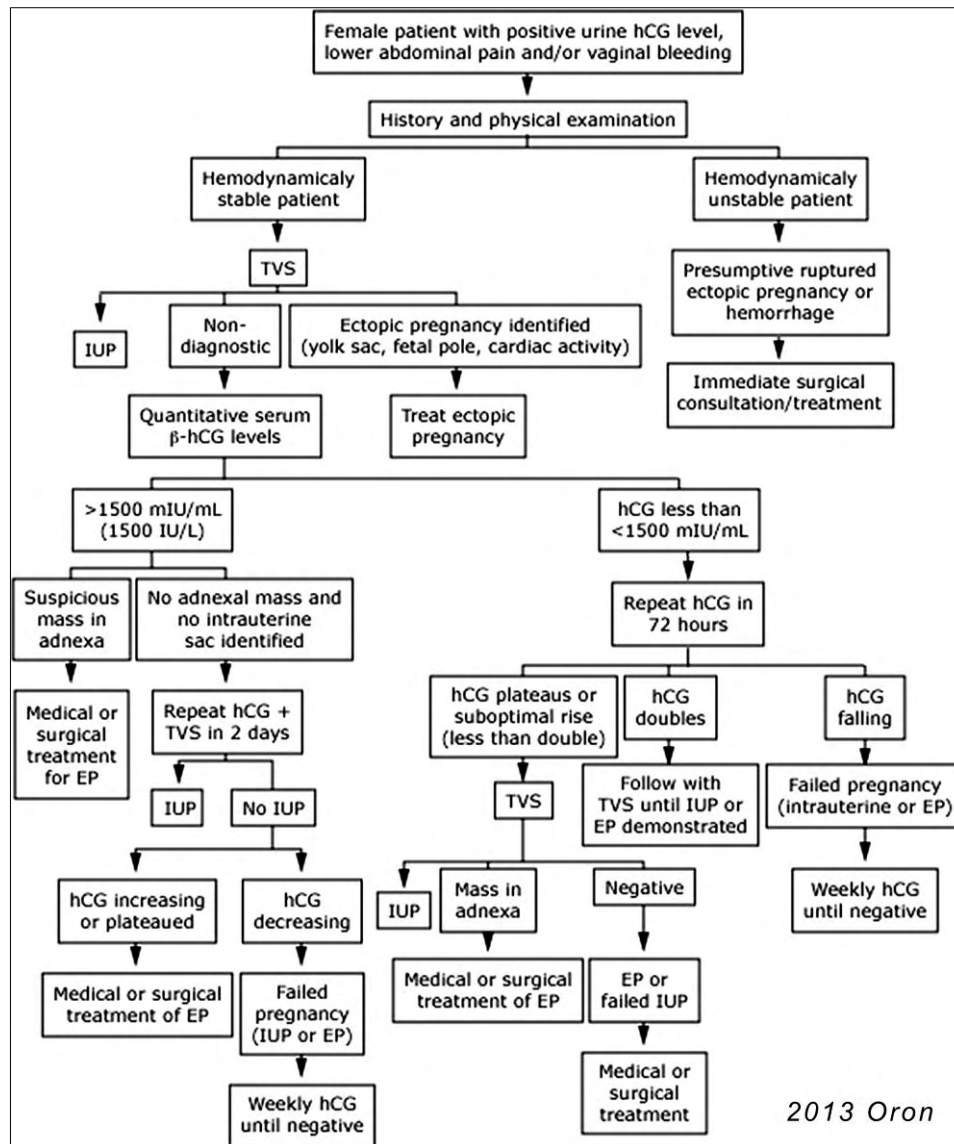
Παρόλα αυτά στις περιπτώσεις όπου υπάρχει η υποψία ετερότοπης κύησης, όπως και όταν η τοποθεσία της εγκυμοσύνης δεν είναι γνωστή, οι τιμές διπλασιασμού της χοριακής μαζί με τις υπερηχογραφικές ενδείξεις πρέπει να παρακολουθούνται μέχρις ότου είτε γίνει γνωστή η τοποθεσία της κύησης (οπότε και μπορεί να προσδιοριστεί η θεραπεία), είτε αυτή εκδράμει φυσιολογικά στο ενδιαμέσο διάστημα παρακολούθησης, είτε χρειαστεί άμεση ιατρική

παρέμβαση για την αντιμετώπισή της. Τα παραπάνω δεδομένα αναδεικνύουν ότι αν και η αναλογία διπλασιασμού της χοριακής δεν είναι διαγνωστική από μόνης της, μπορεί ωστόσο να συμβάλει μαζί με τη χρήση του διακολπικού υπέρηχου στη διαγνωστική προσέγγιση της διαφοροδιάγνωσης μεταξύ έκτοπων, παλίνδρομων και φυσιολογικών ενδομήτριων κύσεων σε αρκετές περιπτώσεις (Seeber 2012). Με βάση τα δεδομένα αυτά αλγόριθμοι έχουν προταθεί για την αντιμετώπιση περιστατικών όπου γυναίκες παρουσιάζονται με θετικό τεστ εγκυμοσύνης και την τριάδα συμπτωμάτων που έχει αναφερθεί, **Εικόνα 22** (Kirk, et al. 2014), **Εικόνα 23** (Oron and Tulandi 2013).

Change in hCG (hCG ratio: hCG 48hrs/hCG 0hrs)	Likely Diagnosis	Follow-Up
>13% decrease (<0.87)	Failed PUL	Urinary pregnancy test in 2 weeks. Repeat serum hCG if +ve.
>66% increase (>1.66)	Normal intra-uterine pregnancy	Repeat TVS on day 7.
<66% increase (1.00 – 1.65)	Probable Ectopic pregnancy	Repeat TVS on day 7 or when hCG expected to be > 1000 IU/L.
<13% decrease (0.87-1.00)	Failing PUL or Possible Ectopic pregnancy	Repeat serum hCG on day 7.

2013 Kirk

**Εικόνα 22 :** Μοντέλο πρόβλεψης του αποτελέσματος μιας κύησης άγνωστης θέσης (PUL) με βάση την αναλογία 48ώρου διαδοχικών μετρήσεων της χοριακής (Kirk, et al. 2014).



**Εικόνα 23 :** Αλγόριθμος διάγνωσης έκτοπης κύησης (Oron and Tulandi 2013).

### Θεραπεία

Οι έκτοπες κυήσεις όπως και οι παλίνδρομες μπορούν να αντιμετωπιστούν με τρεις τρόπους, συντηρητικά (παρακολούθηση εξέλιξης χωρίς επέμβαση), φαρμακευτικά και χειρουργικά (Oron and Tulandi 2013; Shaw, et al. 2012; Sivalingam, et al. 2011). Απαραίτητη προϋπόθεση πριν την επιλογή οποιασδήποτε θεραπείας αποτελεί η επιβεβαίωση ότι η ασθενής δεν έχει μία βιώσιμη ενδομήτρια εγκυμοσύνη, καθώς συνήθως η θεραπευτική προσέγγιση τόσο μιας εκτόπου, όσο και μιας παλίνδρομης κύησης οδηγεί στον τερματισμό της εγκυμοσύνης. Επιπλέον, όταν διαβιβαιωθεί η ύπαρξη μιας μη βιώσιμης κύησης, χρειάζεται να προσδιοριστεί εάν αυτή είναι έκτοπος ή παλίνδρομος, καθώς η θεραπευτική προσέγγιση είναι διαφορετική στις δύο αυτές περιπτώσεις (Rubal and Chung 2012; Shaw, et al. 2012).

Στην περίπτωση των εξωμήτριων κυήσεων έχει παρατηρηθεί ότι ένα ποσοστό τους (47-77%) εκδράμει φυσιολογικά χωρίς εξωτερική παρέμβαση (Oron and Tulandi 2013). Με βάση την παρατήρηση αυτή, ασθενείς που είναι σε σταθερή κατάσταση, ασυμπτωματικοί, με αρχική συγκέντρωση χοριακής <1500-2000 mIU/mL και μειούμενη αναλογία διπλασιασμού χοριακής,



είναι καλοί υποψήφιοι για αυτήν την θεραπεία. Ωστόσο, πρέπει να παρακολουθούνται συνεχώς μέχρι η εγκυμοσύνη να επιλυθεί (χοριακή <5 mIU/mL), ενώ θα πρέπει να είναι ενήμεροι ότι ακόμη και με μειούμενη αναλογία διπλασιασμού της χοριακής έχουν παρουσιαστεί περιπτώσεις ρήξης των έκτοπων κύψεων (Oron and Tulandi 2013; Shaw, et al. 2012; Sivalingam, et al. 2011).

Η φαρμακευτική θεραπεία περιλαμβάνει τη χορήγηση συνήθως μεθοτρεξάτης (methotrexate) ενδομυϊκά σε σχήμα μονής ή πολλαπλής δόσης, με το σχήμα πολλαπλών δόσεων να είναι περισσότερο αποτελεσματικό (Refaat, et al. 2015). Μικρές έρευνες έχουν δείξει ότι η μεθοτρεξάτη μπορεί να χορηγηθεί επίσης και ενδοφλέβια ή από του στόματος με παρόμοια αποτελεσματικότητα, ενώ επίσης μπορεί να χορηγηθεί και τοπικά υπό υπερηχογραφική καθοδήγηση στην έκτοπο κύηση (Stika 2012) (όπως τοπικά μπορούν να χορηγηθούν το χλωριούχο κάλιο και η υπερωσμωτική γλυκόζη, (Refaat, et al. 2015)). Η μεθοτρεξάτη αποτελεί ένα δομικό ανάλογο ανταγωνιστή του φυλικού οξέος, το οποίο παρεμποδίζει τη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων σε γρήγορα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα (Stika 2012). Ως εκ τούτου η χρήση της στην παρουσία μιας έκτοπης κύησης αποτρέπει τον πολλαπλασιασμό των κυτταροτροφοβλαστικών κυττάρων, μειώνει τη βιωσιμότητά τους και την έκκριση της χοριακής, οδηγώντας στη μείωση της υποστήριξης της κύησης μέσω της προγεστερόνης (Sivalingam, et al. 2011).

Ασθενείς που είναι αιμοδυναμικά σταθεροί, έχουν ελάχιστα συμπτώματα, απουσία καρδιακής λειτουργίας εμβρύου και συγκέντρωση χοριακής <3000 mIU/mL, μπορούν να επιλεγούν για αυτόν τον τρόπο θεραπείας, ώσπου υπό στενή παρακολούθηση η χοριακή να πέσει κάτω από 5 mIU/mL (Shaw, et al. 2012). Και σε αυτήν την περίπτωση ενυπάρχει η πιθανότητα ρήξης της εκτόπου κύησης, ενώ επιπλέον η παρουσία μιας ενδομήτριας κύησης (ετερότοπος), οφείλει να έχει αποκλειστεί πριν την χρήση της μεθοτρεξάτης (Oron and Tulandi 2013; Sivalingam, et al. 2011). Αποτελέσματα μιας πρόσφατης ελεγχόμενης τυχαιοποιημένης μελέτης σε 73 γυναίκες με επιβεβαιωμένη υπερηχογραφικά ΕΚ είτε κύηση άγνωστης θέσης, έδειξαν ότι ασθενείς με χαμηλά αρχικά επίπεδα χοριακής (<2000 mIU/mL), που έλαβαν είτε μονό σχήμα μεθοτρεξάτης, είτε συντηρητική θεραπεία, δεν παρουσίασαν διαφορά ως προς την επίλυση της κύησης (van Mello, et al. 2013).

Ενδείξεις για την χειρουργική αντιμετώπιση μιας εξωμήτριας κύησης αποτελούν η αιμοδυναμική αστάθεια της ασθενούς, η διαρρηχθήσα ή επικείμενη ρήξη της κύησης, οι αντενδείξεις προς τη χρήση μεθοτρεξάτης, η αποτυχία του θεραπευτικού σχήματος, καθώς και η συνύπαρξη ενδομήτριας κύησης. Η επέμβαση μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε λαπαροσκοπικά είτε λαπαροτομικά με παρόμοια αποτελέσματα (Oron and Tulandi 2013; Refaat, et al. 2015; Shaw, et al. 2012).

Στην περίπτωση των παλίνδρομων κύψεων περίπου το 90% των γυναικών εκφράζουν προτίμηση για το είδος της θεραπείας (συντηρητική, φαρμακευτική, χειρουργική) που θέλουν να λάβουν, με το 70% εξ αυτών να προτιμούν τη συντηρητική (παρακολούθηση χωρίς επέμβαση). Η συντηρητική θεραπεία παρουσιάζει διακυμάνσεις (28-76%) στο ποσοστό των ΠΚ που οδηγεί σε πλήρη αποβολή του κυήματος, απαιτεί παρακολούθηση μέχρι να επιλυθεί πλήρως η κύηση και ενδέχεται να χρειαστεί επεμβατική προσέγγιση εκκένωσης της μήτρας εάν παρατηρηθεί βαριά αιμορραγία, είτε κατακράτηση των προϊόντων της κύησης (Sur and Raine-Fenning 2009).

Η φαρμακευτική αγωγή περιλαμβάνει τη χρήση συνθετικών προσταγλανδινών, κυρίως της μισοπροστόλης (misoprostol), σε μονό ή πολλαπλό σχήμα δόσης χορηγούμενο είτε από του στόματος είτε κολπικά, η χρήση της οποίας οδηγεί σε συσπάσεις της μήτρας και μαλθακωση του τραχήλου (Ngoc, et al. 2004; Sur and Raine-Fenning 2009; Tang, et al. 2007). Σε

ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να γίνει προηγούμενη χρήση και αντι-προγεστανοειδούς (μιφεπριστόνη, mifepristone) για την αποκόλληση του πλακούντα και συνεπικουρία στη διάταση του τραχήλου. Η αποτελεσματικότητα της χρήσης της μισοπροστόλης στην επίλυση της κύησης παρουσιάζει διακύμανση (52-92%), με τα υψηλότερα ποσοστά επιτυχίας να σχετίζονται με κυήσεις μικρής ηλικίας ανάπτυξης (<10 εβδομάδες ανάπτυξης), ενώ μπορεί να συνοδεύεται από βαριά αιμορραγία και κατακράτηση των προϊόντων της κύησης, στην οποία περίπτωση απαιτείται χειρουργική εκκένωση της μήτρας, καθώς και με επακόλουθη μόλυνση μετά την απομάκρυνση των κατακρατημένων προϊόντων της κύησης (Sur and Raine-Fenning 2009). Αντενδείξεις στη χρήση της μισοπροστόλης αποτελούν η αλλεργία στη μισοπροστόλη, η παρουσία έκτοπης κύησης, η ασταθής αιμοδυναμική κατάσταση της ασθενούς καθώς και η παρουσία φλεγμονών της πυέλου (Gemzell-Danielsson, et al. 2007). Συγκριτικά σε σχέση με την συντηρητική θεραπεία, η χρήση μισοπροστόλης παρουσιάζει μικρή μείωση στην πιθανότητα ανάγκης επεμβατικού χειρουργείου, ωστόσο έχει προταθεί ότι η μικρή αυτή βελτίωση δεν δικαιολογεί την χρήση της, καθώς τα ποσοστά επίλυσης της κύησης είναι παρόμοια και με τους δύο τρόπους (Sur and Raine-Fenning 2009).

Η χειρουργική επέμβαση περιγράφεται ως εκκένωση των κατακρατημένων προϊόντων της κύησης (ERPC, evacuation of retained products of conception) και μπορεί να γίνει με δύο τρόπους είτε με διαστολή και απόξεση (dilation and curettage), είτε με διαστολή και αναρρόφηση, με την δεύτερη τεχνική να είναι η προτεινόμενη καθώς σχετίζεται με λιγότερη απώλεια αίματος, είναι λιγότερο επώδυνη (2009 Sur) και δεν παρουσιάζει ρίσκο εμφάνισης ενδομήτριων συμφύσεων (σύνδρομο Asherman's, (Gilman Barber, et al. 2014; Tang and Ho 2006)). Η αποτελεσματικότητα ωστόσο και των δύο μεθόδων είναι υψηλή και παρόμοια (95-100%). Το μειονέκτημα της επεμβατικής διαδικασίας είναι η χρήση αναισθησίας καθώς και ο ενδεχόμενος τραυματισμός της μήτρας ή/και του τραχήλου, ενώ σε σχέση τόσο με την συντηρητική όσο και με την φαρμακευτική αντιμετώπιση υπερτερεί στην αποτελεσματικότητα της αφαίρεσης των προϊόντων της κύησης, άρα υπερτερεί και στη μικρότερη πιθανότητα επόμενης θεραπευτικής παρέμβασης (Sur and Raine-Fenning 2009).

### **Βιοδείκτες στην εξωμήτρια και παλίνδρομη κύηση**

Ο συνδυασμός της χρήσης του διακολπικού υπέρηχου καθώς και οι διαδοχικές μετρήσεις για τον προσδιορισμό της αναλογίας διπλασιασμού 48ώρου της χοριακής γοναδοτροπίνης, όπως έχει ήδη αναφερθεί, βοηθούν σε αρκετές περιπτώσεις στον διαχωρισμό των φυσιολογικών ενδομήτριων από τις έκτοπες και τις παλίνδρομες κυήσεις (Seeber 2012).

Ωστόσο, τις περισσότερες φορές απαιτείται αναμονή μέχρις ότου προσδιοριστεί με βεβαιότητα η βιωσιμότητα και η τοποθεσία της κύησης, γεγονός που εγκυμονεί τον κίνδυνο της ρήξης μιας ενδεχόμενης μη προσδιορισμένης έκτοπης κύησης, ενώ επιπλέον σε αρκετές περιπτώσεις η τοποθεσία της κύησης παραμένει άγνωστη (είτε μετά την πάροδο ενός χρονικού διαστήματος, είτε όταν απαιτείται επείγουσα επέμβαση), με αποτέλεσμα βιώσιμες ενδομήτριες κυήσεις να αντιμετωπίζονται θεραπευτικά ως έκτοπες ή παλίνδρομες (τερματισμός κύησης) (Barnhart, et al. 2011; Rubal and Chung 2012; Shaw, et al. 2012). Η παρατηρούμενη αδυναμία του κολπικού υπέρηχου να παρέχει κρίσιμες πληροφορίες όταν η κύηση είναι αρχόμενη καθώς και η επικάλυψη των τιμών της χοριακής που δεν επιτρέπει τον διαχωρισμό ενδομήτριων κυήσεων από έκτοπες καθώς και έκτοπων από παλίνδρομες (Cabar, et al. 2008; Shaw, et al. 2012), θα μπορούσε να ωφεληθεί από τη χρήση ενός βιοδείκτη που θα προσδιόριζε είτε την τοποθεσία, είτε τη βιωσιμότητα, είτε το αποτέλεσμα μιας αρχόμενης κύησης (Palmer and Barnhart 2013; Shaw, et al. 2012).



Οι βιοδείκτες αποτελούν χαρακτηριστικά, τα οποία μπορούν αντικειμενικά να μετρηθούν και να αξιολογηθούν ως δείκτης, είτε μιας φυσιολογικής ή παθολογικής διαδικασίας, είτε της φαρμακολογικής απάντησης σε μια θεραπευτική παρέμβαση. Τα χαρακτηριστικά που μπορεί να μετρούνται ποικίλουν από τη μορφολογία (π.χ. ακτινογραφία) μέχρι το γενετικό υλικό (genetic markers) και τα βιολογικά μόρια (molecular markers) (Palmer and Barnhart 2013). Ένας μοριακός βιοδείκτης θα πρέπει να μπορεί εύκολα να ληφθεί (π.χ. από το αίμα του ασθενή), να μπορεί να δώσει γρήγορα, ακριβή και αξιόπιστα αποτελέσματα με πραγματική κλινική αξία, να είναι οικονομικός στη χρήση του και να αντανάκλα στοιχεία μιας ασθένειας για την οποία ο μη-επεμβατικός έλεγχος, είτε η ανίχνευση σε αρχικό στάδιο, προσφέρουν κλινική ωφέλεια (Palmer and Barnhart 2013; Shaw, et al. 2012).

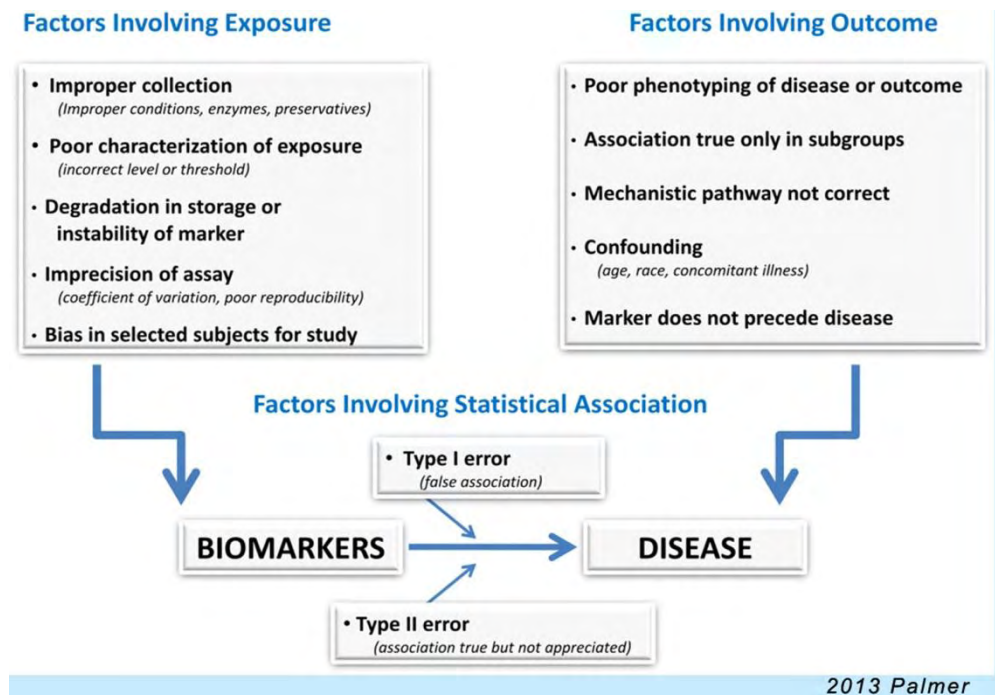
Οι μοριακοί βιοδείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την διάγνωση ή την πρόγνωση μιας ασθένειας, για να κατευθύνουν τη διαγνωστική διαδικασία μειώνοντας την πολυπλοκότητά της ή το κόστος της, για να ταυτοποιήσουν άτομα στα οποία μια ασθένεια μπορεί να προληφθεί, καθώς και για να καθορίσουν την απάντηση σε φάρμακα είτε να λειτουργήσουν ως πιθανοί στόχοι τους. Ο τελικός στόχος ωστόσο, συνολικά, της χρήσης των βιοδεικτών είναι η βελτίωση του αποτελέσματος των ιατρικών διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα κατά την αντιμετώπιση μιας ασθένειας (πρόληψη, διάγνωση, αντιμετώπιση) καθώς και η μείωση του κόστους των διαδικασιών αυτών (Palmer and Barnhart 2013).

Στον τομέα της αναπαραγωγική ιατρικής, η χρήση ενός βιοδείκτη που θα μπορούσε να προσδιορίσει την τοποθεσία, τη βιωσιμότητα (διάγνωση), ή το τελικό αποτέλεσμα μιας αρχόμενης κύησης (πρόγνωση), ασφαλώς θα μπορούσε να μειώσει τον αριθμό επισκέψεων των ασθενών επιταχύνοντας τη διαδικασία αντιμετώπισής τους και μειώνοντας το συνολικό κόστος (οικονομικό, νομικό, ψυχολογικό). Με αυτόν τον τρόπο, περισσότερες γυναίκες με έκτοπο κύηση θα μπορούσαν να αντιμετωπιστούν με συντηρητική είτε φαρμακευτική θεραπεία αποφεύγοντας μία επεμβατική διαδικασία, ενώ ταυτόχρονα λιγότερες γυναίκες με βιώσιμες εγκυμοσύνες θα κινδύνευαν να οδηγηθούν σε τερματισμό της εγκυμοσύνης τους. Ένας ιδανικός βιοδείκτης για τις έκτοπες κυήσεις θα ήταν ασφαλώς ένα μόριο, το οποίο να εκφράζεται αποκλειστικά και μόνον από την έκτοπη τροφοβλάστη και όχι από την ευτοπικά εμφυτευμένη, είτε από την πλευρά της μητέρας, ένα μόριο που να εκφράζεται από τον βλεννογόνο της σάλπιγγας μόνον μετά από την έκτοπο εμφύτευση (αν και στη δεύτερη περίπτωση θα μπορούσαν να ανιχνευτούν μόνον η σαλπιγγικής προέλευσης έκτοπες κυήσεις) (Shaw, et al. 2012).

Για να κατορθώσει ωστόσο ένας βιοδείκτης να φτάσει να χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη, μία εκτεταμένη και χρονοβόρα διαδικασία λαμβάνει χώρα η οποία περιλαμβάνει τέσσερα στάδια. Στο πρώτο (προκλινικό) στάδιο γίνεται η ταυτοποίηση ενός υποσχόμενου δείκτη, είτε μέσω της αξιολόγησης πιθανών δεικτών με βάση τον μηχανισμό της ασθένειας, είτε μέσω της ανακάλυψης υποψηφίων δεικτών (discovery assay). Στο δεύτερο (κλινικό) στάδιο, γίνεται επιβεβαίωση των αρχικών ευρημάτων σε παρόμοιο πληθυσμό ασθενών (μέσω του clinical assay που αντικαθιστά το discovery assay), όπου προσδιορίζεται η ικανότητα ανίχνευσης της ασθένειας σε ήδη γνωστά δείγματα. Στο τρίτο στάδιο γίνεται αναδρομική ή διαχρονική μελέτη (retrospective/longitudinal cohort study) για να προσδιοριστεί εάν ο βιοδείκτης μπορεί να ανιχνεύσει την ασθένεια πριν αυτή εμφανίσει κλινικά συμπτώματα και στο τέταρτο στάδιο γίνεται επιβεβαίωση της ικανότητας του βιοδείκτη σε προοπτική μελέτη ανίχνευσης (prospective screening), η οποία προσδιορίζει το εύρος ή τα χαρακτηριστικά της ασθένειας που ανιχνεύονται με τη χρήση του (Palmer and Barnhart 2013; Pepe, et al. 2001; Rausch and Barnhart 2012).

Με βάση τα παραπάνω είναι εμφανές ότι η πορεία πολλών βιοδεικτών προς την κλινική χρήση τους, ανακόπτεται τελικά καθώς δεν πληρούν τις αναγκαίες προϋποθέσεις. Ένας

αριθμός παραγόντων που σχετίζονται, είτε με την ασθένεια είτε με το αποτέλεσμα της, καθώς επίσης και η ίδια η στατιστική επεξεργασία, μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά την εξέλιξη ενός βιοδείκτη και συνοψίζονται στην **εικόνα 24** (Palmer and Barnhart 2013).

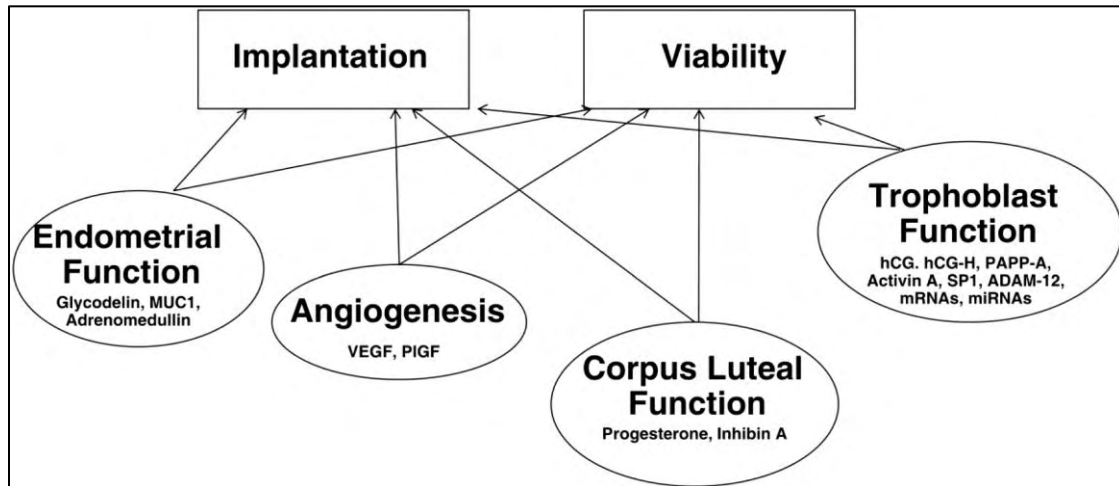


**Εικόνα 24** :Παράγοντες που επηρεάζουν την πορεία εξέλιξης ενός βιοδείκτη (Palmer and Barnhart 2013).

Στο πεδίο της αναπαραγωγής, πέρα από την έμφυτη δυσκολία που υπάρχει ήδη στην πορεία ανάπτυξης ενός οποιουδήποτε βιοδείκτη (τα τέσσερα στάδια που πρέπει να περάσει), οι περιορισμένοι σχεδίου μελέτες με μικρό αριθμό δειγμάτων, είτε με δείγματα χωρίς συμφωνία των εβδομάδων κύησης, δυσχεραίνουν περισσότερο την ανάπτυξη των βιοδεικτών. Επιπλέον, ασυνέπεια παρατηρείται μεταξύ της ανακάλυψης ή προσδιορισμού ενός πιθανού βιοδείκτη και της επόμενης και αναγκαίας επιβεβαίωσής του, ενώ επίσης για όσους δείκτες καταφέρνουν να προχωρήσουν στα επόμενα στάδια, οι αλλαγές στον τρόπο ανίχνευσης (kit ανίχνευσης, αντιδραστήρια) δεν επιτρέπουν τη σύγκριση και δημιουργούν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Ταυτόχρονα, ο κλάδος μαστίζεται από την έλλειψη συμφωνίας στην ορολογία που χρησιμοποιείται για την περιγραφή και τον σαφή προσδιορισμό μιας αρχόμενης κύησης (λόγου χάρη η ασυμφωνία στον τρόπο χρήσης του όρου κύηση άγνωστης θέσης), γεγονός που επιβαρύνει την έρευνα, ενώ επίσης παρατηρείται εγγενώς μεγάλη ετερογένεια στις περιπτώσεις των έκτοπων κυήσεων (βιώσιμες, εκδράμουςες, τιμές χοριακής), η οποία συμβάλει περαιτέρω στην δυσκολία της σύγκρισής τους (Horne, et al. 2010; Shaw, et al. 2012). Με βάση τα παραπάνω δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι στον τομέα αυτόν, οι περισσότεροι βιοδείκτες βρίσκονται στα αρχικά στάδια ανάπτυξης (στάδιο I-III) και ελάχιστοι στο στάδιο IV (χοριακή και προγεστερόνη), ενώ μέχρι στιγμής κανένας δεν έχει κατορθώσει να φτάσει στην κλινική πράξη (Rausch and Barnhart 2012; Senapati and Barnhart 2013).

Μια διεξοδική αναφορά των πάνω από 20 μοριακών δεικτών, που έχουν μελετηθεί στο πλαίσιο των έκτοπων κυήσεων, υπάρχει στις εργασίες των Cartwright et al 2009 και Rausch et al 2012 (Cartwright, et al. 2009; Rausch and Barnhart 2012). Μια κατηγοριοποίηση των βιοδεικτών με βάση τη φυσιολογία, όπως έχει προταθεί από τους Senapati et al. (2013) παρουσιάζεται συνοπτικά στην **εικόνα 25** (Senapati and Barnhart 2013). Περιλαμβάνει

παράγοντες που επηρεάζουν την εμφύτευση και τη βιωσιμότητα του εμβρύου, οι οποίοι σχετίζονται με την αγγειογένεση (VEGF, PIGF) καθώς και τη λειτουργία του ενδομητρίου (LIF, Glycodelin, MUC1, Adrenomedullin), του ωχρού σωματίου (προγεστερόνη, ινχιμπίνη Α) και της τροφοβλάστης (βhCG, hCG-H, PAPP-A, ακτιβίνη Α, SP1, ADAM12, mRNAs, miRNAs). Δείκτες φλεγμονής όπως το CA-125, οι ιντερλευκίνες (IL-6,8,10,11) και οι κυτοκίνες (TNFα), όπως και δείκτες που σχετίζονται με τη μυϊκή βλάβη των σαλπίνγων (CK, myosin, myoglobin), έχουν επίσης μελετηθεί (Senapati and Barnhart 2013).



**Εικόνα 25:** Βιολογικά μονοπάτια αρχόμενης εγκυμοσύνης, (Senapati and Barnhart 2013).

Από τους πιθανούς δείκτες αυτούς, έξι ενδέχεται να σχετίζονται με τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας της κύησης (αναλογία 48ώρου hCG, PAPP-A, πλακουντιακά mRNAs, P4, ινχιμπίνη Α, PIGF) όπου τα χαμηλά επίπεδά τους μαρτυρούν μη-βιώσιμη κύηση, και πέντε ενδέχεται να σχετίζονται με την εξωμήτρια τοποθεσία (ακτιβίνη Α, γλυκοδελίνη, ADAM12, χαμηλά επίπεδα/ πλακουντιακά miRNAs, VEGF, υψηλά επίπεδα). Δυστυχώς, τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα κατά τη σύγκριση των μελετών, ωστόσο, τις υψηλότερες τιμές >80% σε ειδικότητα και ευαισθησία τουλάχιστον σε μία μελέτη έχουν παρουσιάσει, η αναλογία 48ώρου hCG, η ακτιβίνη Α, η ινχιμπίνη Α, η προγεστερόνη και ο VEGF (Senapati and Barnhart 2013).

Σε σχέση με τα χαρακτηριστικά των βιοδεικτών που είναι επιθυμητό να είναι μέγιστα (ιδανικά χρειάζεται να είναι μέγιστα και τα δύο, ευαισθησία και ειδικότητα), υπάρχει διχογνωμία σχετικά με το ποιο χαρακτηριστικό προσδίδει μεγαλύτερη ωφέλεια από τη μεγιστοποίησή του. Έτσι, ένας βιοδείκτης με μεγαλύτερη ευαισθησία, αναγνωρίζει με ασφάλεια περισσότερες γυναίκες με την ασθένεια (έκτοπη κύηση), αλλά ταυτόχρονα αναγνωρίζει (λανθασμένα) και περισσότερες γυναίκες χωρίς την ασθένεια (φυσιολογική κύηση), ενώ ένας δείκτης με μεγαλύτερη ειδικότητα, αναγνωρίζει με ασφάλεια περισσότερες γυναίκες με φυσιολογική κύηση και ταυτόχρονα αναγνωρίζει (λανθασμένα) και περισσότερες γυναίκες με την έκτοπη κύηση. Η καμπύλη ROC (receiver operating curve), η οποία χρησιμοποιείται για την εκτίμηση των χαρακτηριστικών αυτών των βιοδεικτών (ευαισθησία και ειδικότητα), μπορεί να είναι παραπλανητική στην ερμηνεία της, καθώς η εκτίμηση της περιοχής κάτω από την καμπύλη (AUC, area under the curve) που μπορεί να συγκριθεί στατιστικά, υποθέτει κατά τον προσδιορισμό της τη μεγιστοποίηση και των δύο ιδιοτήτων. Στην κλινική πράξη ωστόσο, η βαρύτητα μιας λάθους διάγνωσης είναι εξαιρετικά σημαντική (Palmer and Barnhart 2013), καθώς μπορεί να οδηγήσει λόγω χάρη μία γυναίκα με φυσιολογική ενδομήτρια κύηση να αντιμετωπιστεί ως έκτοπη (τερματισμός κύησης).

Καθώς η μεμονωμένη μελέτη κάθε βιοδείκτη δεν έχει αποφέρει τη μεγιστοποίηση των επιθυμητών χαρακτηριστικών της ευαισθησίας και ειδικότητας, η συνδυαστική χρήση τους

έχει επίσης μελετηθεί, με τον τετραπλό συνδυασμό προγεστερόνης, ακτιβίνης A, ινχιμπίνης A και VEGF, να έχει παρουσιάσει τα υψηλότερα ποσοστά ευαισθησίας (90-98%) και ειδικότητας (100%) στον διαχωρισμό έκτοπων από φυσιολογικές ενδομήτριες κυήσεις ( με τιμές χοριακής <1500mIU/mL και ανιχνεύοντας μόνο το 42% των δειγμάτων, χωρίς έλεγχο σε γυναίκες με παλινδρομο κύηση). Ο δεύτερος καλύτερος συνδυασμός δεικτών ήταν ο τριπλός συνδυασμός των VEGF, PAPP-A και προγεστερόνης, ο οποίος είχε 97,7% ευαισθησία και 92,4% ειδικότητα στη διάκριση έκτοπων από φυσιολογικές ενδομήτριες κυήσεις και αναμένεται η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων αυτών και σε πληθυσμό έρευνας που να περιλαμβάνει επίσης και γυναίκες με παλινδρομο κύηση (Rausch and Barnhart 2012; Senapati and Barnhart 2013). **Πίνακας 3** (Senapati and Barnhart 2013).

**Πίνακας 3:** Χρήση πολλαπλών βιοδεικτών στην πρόγνωση της έκτοπης κύησης (Senapati and Barnhart 2013).

Markers	Study	Sensitivity	Specificity	Phase of Development/Conclusions
Estradiol, Progesterone, CA-125	Witt 1990	N/A	N/A	III: Needs replication to assess test characteristics and prospective assessment
VEGF, PAPP-A, Progesterone	Mueller 2004	97.7%	92.4%	III: needs validation with abnormal IUP
Progesterone, Activin A, Inhibin A, VEGF	Rausch 2011	90-98%	100%	III: diagnostic in 42% of patients; needs validation with abnormal IUP
Activin A, Progesterone, HCG	Warrick 2012	70%	69%	III: no benefit over hCG alone
hCG, Progesterone, miR-323-3p	Zhao 2012	96.3%	72.6%	III: needs validation in other cohorts and prospective assessment

Επιπρόσθετα, στην προσπάθεια ανακάλυψης νέων βιοδεικτών έχει συμβάλει και η ανάπτυξη και δημοτικότητα της τεχνολογίας των “omics” (genomics, proteomics, transcriptomics κ.ά.)(2013 Palmer). Μέσω της σύγκρισης της γονιδιακής έκφρασης ιστών ενδομητρίου από γυναίκες με φυσιολογική και έκτοπο κύηση, προέκυψε η παρατήρηση ότι η ακτιβίνη B ήταν μειωμένη στον φθαρτό έκτοπων κυήσεων σε σχέση με τις ενδομήτριες, η οποία μετέπειτα συσχετίστηκε με αντίστοιχα χαμηλά επίπεδα της ακτιβίνης B στον ορό των γυναικών με έκτοπο κύηση, μαρτυρώντας τη δυνατότητα ανακάλυψης νέων πιθανών βιοδεικτών μέσω της τεχνολογίας των genomics (2008 Horne, 2010 Horne). Η πρωτεομική σύγκριση (proteomics) δειγμάτων ορού από γυναίκες με έκτοπο και φυσιολογική ενδομήτρια κύηση, αποκάλυψε επίσης νέους βιοδείκτες όπως η ADAM12, η φιμπρονεκτίνη και η isthmin 2, με την ADAM12 να έχει ήδη επιβεβαιωθεί ως πιθανός βιοδείκτης από μετέπειτα έρευνα, παρουσιάζοντας χαμηλά επίπεδα στις εξωμήτριες κυήσεις σε σχέση με τις ενδομήτριες (Rausch and Barnhart 2012; Senapati and Barnhart 2013).

Στη χρήση των τεχνολογιών αυτών ωστόσο, οι οποίες γεννούν μεγάλο αριθμό δεδομένων που απαιτούν ανάλυση, ανακύπτει και το θέμα της υπερ-ανάλυσης των δεδομένων (data driven analysis) που μπορεί να δώσει ψευδώς θετικές συσχετίσεις (Palmer and Barnhart 2013) ή να αποσιωπήσει την παρουσία άλλων πιθανών συσχετίσεων, όπως φαίνεται από την μετέπειτα μελέτη των Duncan, et al. (2011), στην οποία η έκφραση της ακτιβίνης B δεν παρουσιάστηκε να διαφέρει σημαντικά κατά τη σύγκριση γονιδιακής έκφρασης από ιστούς φθαρτού ενδομητρίου γυναικών με έκτοπη και με φυσιολογική κύηση, όπως θα ήταν αναμενόμενο με βάση την προηγούμενη μελέτη των Horne, et al. (2008) (Duncan, et al. 2011; Horne, et al. 2008).

Τα παραπάνω δεδομένα μαρτυρούν ότι η πολλά υποσχόμενη τεχνολογία των “omics” μπορεί μετά από προσεκτική ανάλυση και επιβεβαίωση από ανεξάρτητες μελέτες, να δώσει γένεση σε καινούριους πιθανούς βιοδείκτες, οι οποίοι ωστόσο, όπως και οι ήδη μελετημένοι (με αντικρουόμενα αποτελέσματα) βιοδείκτες, οφείλουν να ερευνηθούν σε μεγάλες αναδρομικές και προοπτικές μελέτες, ώστε να γίνει εκτίμηση των δυνατοτήτων τους.

## Οι ακτιβίνες ως βιοδείκτες

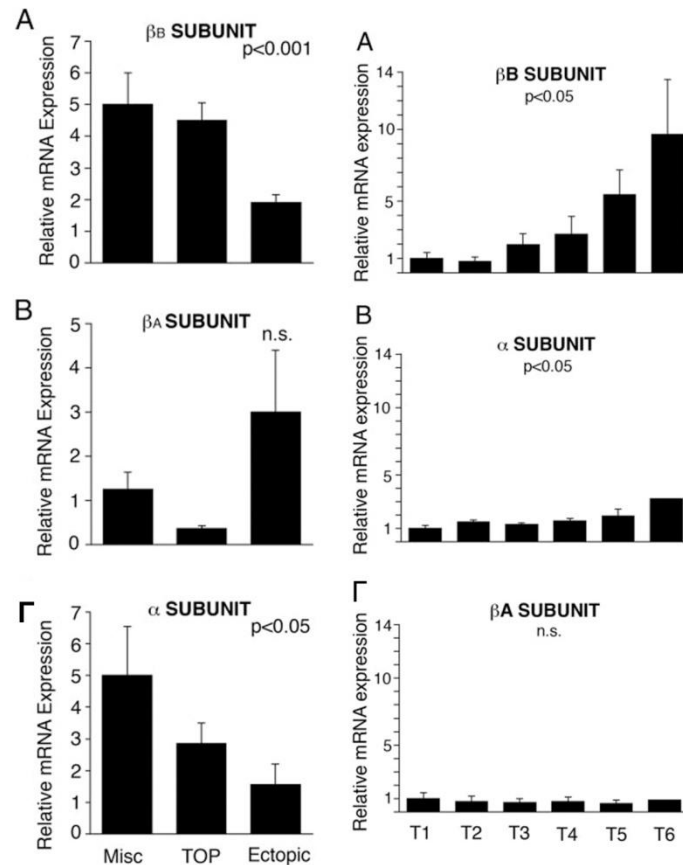
Από την οικογένεια των ακτιβινών-ινχιμπινών, η ακτιβίνη A και η ινχιμπίνη A είναι οι πλέον μελετημένες πρωτεΐνες, σε σχέση με την ικανότητά τους να δρουν ως βιοδείκτες. Η ακτιβίνη A πιο συγκεκριμένα, έχει μελετηθεί σε πληθώρα παθολογικών καταστάσεων που σχετίζονται με την εγκυμοσύνη (προεκλαμψία, μειωμένη ενδομήτρια ανάπτυξη εμβρύου (IUGR, intrauterine growth restriction)), πρώιμος τοκετός, σύνδρομο Down) όπου τα αυξημένα επίπεδά της στον ορό έχουν βρεθεί να σχετίζονται θετικά με τις εν λόγω καταστάσεις (Barkehall-Thomas, et al. 2006; Lim, et al. 2015; Morpurgo, et al. 2004; Petraglia, et al. 1995; Robertson 2012; Rosenberg, et al. 2012; Williamson, et al. 2015), καθώς και στην πορεία εμφύτευσης, όπου τα αυξημένα επίπεδα της ακτιβίνης A σε δείγματα εκπλύσεων της μητρικής κοιλότητας (uterine washing fluid), βρέθηκαν να σχετίζονται θετικά με την επιτυχή επακόλουθη εμφύτευση (Florio, et al. 2010a). Επιπλέον, τα επίπεδα στον ορό τόσο της ακτιβίνης A όσο και της ακτιβίνης B, έχουν βρεθεί να είναι υψηλά σε καταστάσεις οι οποίες σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση και την φλεγμονή (H1N1, ηπατίτιδα C, οξεία πνευμονική ανεπάρκεια), όπου σε συγκεκριμένες περιπτώσεις μπορούν αντικατοπτρίσουν τη σοβαρότητα της κατάστασης (de Kretser, et al. 2013; Hedger and de Kretser 2013; Linko, et al. 2014; Refaat, et al. 2014). Ωστόσο, παρά την ευρεία μελέτη που έχει πραγματοποιηθεί, οι ακτιβίνες δεν έχουν φτάσει ακόμα στο σημείο να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικοί δείκτες σε καμία από τις παραπάνω καταστάσεις (McNeilly 2012).

Σε σχέση με τις έκτοπες και τις παλίνδρομες κυήσεις, οι ακτιβίνες έχουν μελετηθεί (κυρίως η ακτιβίνη A) τόσο στο επίπεδο της έκφρασής τους στους ιστούς, όσο και στο επίπεδο ανίχνευσής τους στον ορό γυναικών. Πιο συγκεκριμένα, το επίπεδο έκφρασης της ακτιβίνης A (όπως και των υποδοχέων τύπου II και της φολλιστατίνης), βρέθηκε να είναι υψηλό, σε δείγματα βιοψιών σαλπίγγων έκτοπων κυήσεων, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (ψευδοκύηση) (Refaat 2014). Σε δύο από τις τρεις συνολικά εργασίες που ανέφεραν τα επίπεδα έκφρασης της ακτιβίνης A σε βιοψίες σαλπίγγων έκτοπων κυήσεων σε επίπεδο πρωτεΐνης και mRNA, βρέθηκε ότι η υψηλή έκφραση σε επίπεδο πρωτεΐνης συνοδεύονταν από χαμηλό επίπεδο mRNA. Ο λόγος της διαφοράς αυτής είναι άγνωστος, μπορεί ωστόσο να οφείλεται στον υψηλό ρυθμό αποδόμησης του mRNA (Refaat, et al. 2009; Refaat, et al. 2008; Refaat, et al. 2012). Επιπλέον, υψηλότερη έκφραση της ακτιβίνης A βρέθηκε σε ασθενείς με έκτοπο κύηση, οι οποίοι ήταν ταυτόχρονα θετικοί για την παρουσία αντισωμάτων έναντι του *Chlamydia trachomatis*, σε σχέση με ασθενείς με έκτοπο κύηση χωρίς παρουσία των αντίστοιχων αντισωμάτων (Refaat, et al. 2009).

Η έκφραση της βB υπομονάδας μελετήθηκε σε δύο εργασίες, οι οποίες ανέφεραν ότι δεν υπήρχε διαφορά στην έκφραση τόσο σε επίπεδο πρωτεΐνης όσο και σε επίπεδο mRNA, μεταξύ των έκτοπων βιοψιών και της ομάδας ελέγχου, υποδεικνύοντας ότι η ακτιβίνη B δεν φαίνεται να συσχετίζεται με τις σαλπιγγικής προέλευσης έκτοπες κυήσεις, ούτε με την απάντηση στην παρουσία του *Chlamydia trachomatis* (Refaat, et al. 2009; Refaat, et al. 2008). Περαιτέρω, μελέτη του επιπέδου έκφρασης της ακτιβίνης A κατά το μήκος των σαλπίγγων σε βιοψίες έκτοπων κυήσεων, δεν παρουσίασε σημαντική διαφορά μεταξύ του σημείου εμφύτευσης και άλλων σημείων, υποδηλώνοντας ότι τα υψηλά παρατηρούμενα επίπεδα έκφρασης της ακτιβίνης A μπορεί να συσχετίζονται με την παθογένεια της δημιουργίας της σαλπιγγικής έκτοπης κύησης, όχι όμως με τον προσδιορισμό της θέσης εμφύτευσης (Refaat, et al. 2012).

Όσον αφορά την έκφραση από το ενδομήτριο, μία μόνο μελέτη έχει αναφέρει αποτελέσματα σε σχέση τις έκτοπες, τις παλίνδρομες και τις φυσιολογικές κυήσεις. Στην εργασία των Horne et al. 2008, όπου έγινε μελέτη της συγκριτικής έκφρασης, σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης, βιοψιών ενδομητρίου από τις τρεις παραπάνω κατηγορίες γυναικών, βρέθηκε ότι η

υπομονάδα βB της ακτιβίνης εκφράζεται σε χαμηλότερο βαθμό στο φθαρτό έκτοπων κυήσεων, σε σχέση τόσο με τις ενδομήτριες όσο και με τις παλίνδρομες κυήσεις (επίπεδο mRNA). Η βA υπομονάδα της ακτιβίνης είχε διαφορετικό πρότυπο έκφρασης, με υψηλότερα επίπεδα στις έκτοπες κυήσεις και χαμηλότερα στις παλίνδρομες και στις ενδομήτριες, χωρίς ωστόσο να παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των κατηγοριών αυτών, ενώ η άλφα υπομονάδα της ινχιμπίνης βρέθηκε να έχει χαμηλότερη έκφραση στις έκτοπες κυήσεις σε σχέση με τις παλίνδρομες (επίπεδο mRNA) (Horne, et al. 2008), **εικόνα 26** (Horne, et al. 2008).



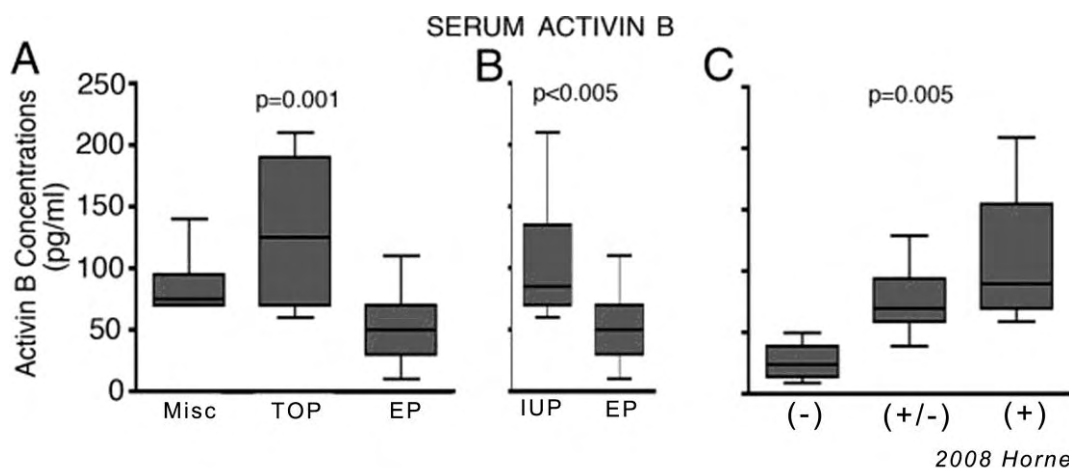
**Εικόνα 26 :** (Αριστερά) Επίπεδα έκφρασης mRNA των υπομονάδων της ακτιβίνης και της ινχιμπίνης στον φθαρτό του ενδομητρίου. Α) η βB υπομονάδα είναι μειωμένη στις σαλπινγικές έκτοπες κυήσεις σε σχέση με τις παλίνδρομες ( $p < 0.01$ ) και με τις ενδομήτριες κυήσεις ( $p < 0.01$ ). Β) Δεν υπήρχε διαφορά στην έκφραση της βA υπομονάδας μεταξύ των ομάδων. Γ) η άλφα υπομονάδα παρουσιάζει μειωμένη έκφραση στις έκτοπες κυήσεις σε σχέση με τις παλίνδρομες κυήσεις ( $p < 0.05$ ). TOP, termination of pregnancy.

(Δεξιά) Επίπεδα έκφρασης mRNA υπομονάδων ακτιβίνης και ινχιμπίνης κατά την επαγωγή φθαρτοποίησης κυττάρων στρώματος ενδομητρίου *in vitro*. Α) η έκφραση της βB υπομονάδας αυξήθηκε κατά τη διάρκεια της φθαρτοποίησης ( $p < 0.05$ ). Β) η άλφα υπομονάδα της ινχιμπίνης επίσης αυξήθηκε αλλά σε μικρότερο βαθμό ( $p < 0.05$ ). Γ) δεν υπήρχε διαφορά στην έκφραση της βA υπομονάδας. Ns, not significant. (Horne, et al. 2008).

Η διαφορετική έκφραση της ακτιβίνης Β, βρέθηκε να συσχετίζεται επίσης και με το βαθμό φθαρτοποίησης του ενδομητρίου στα δείγματα των βιοψιών (χαμηλή φθαρτοποίηση στις

έκτοπες κυήσεις σε σχέση με τις φυσιολογικές ενδομήτριες και με τις παλίνδρομες, ενώ επιπλέον παρατηρήθηκε ότι μετά από *in vitro* επαγωγή φθαρτοποίησης κυττάρων στρώματος η έκφραση της ακτιβίνης B παρουσίασε χρονικά εξαρτώμενη αύξηση παράλληλη της αύξησης της φθαρτοποίησης των κυττάρων στρώματος, ενώ η ακτιβίνη A δεν αυξήθηκε καθόλου κατά την επαγωγή της φθαρτοποίησης (επίπεδο mRNA), **εικόνα 26** (Horne, et al. 2008). Τα δεδομένα αυτά ωστόσο, έρχονται σε σύγκρουση με την αυξημένη έκφραση της ακτιβίνης A (επίπεδο πρωτεΐνης) που έχει αναφερθεί κατά τη φθαρτοποίηση στην αρχόμενη εγκυμοσύνη (Jones, et al. 2002; Jones, et al. 2006c) και περαιτέρω αναδεικνύουν την πολυπλοκότητα που μπορεί να ανακύπτει κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών, καθώς όπως έχει ήδη αναφερθεί υπάρχουν καταγεγραμμένες περιπτώσεις διαφορετικών επιπέδων mRNA και πρωτεΐνης για την ακτιβίνη A (Hedger and de Kretser 2013).

Στην ίδια εργασία των Horne et al. (2008), έγινε επίσης καταγραφή των επιπέδων της ακτιβίνης B στον ορό των γυναικών με έκτοπη, παλίνδρομη και φυσιολογική ενδομήτρια κύηση (n=11,6,8/ mean gestation day=58,57,58 αντίστοιχα, μέτρηση με διπλή ELISA για την ολική ακτιβίνη B= δεσμευμένη από φολλιστατίνη και ελεύθερη), όπου παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα της ακτιβίνης B ήταν στατιστικά χαμηλότερα στις έκτοπες κυήσεις σε σχέση με τις ενδομήτριες κυήσεις, χωρίς ωστόσο να αναφέρεται εάν η ακτιβίνη B είχε την ικανότητα διαχωρισμού των έκτοπων από τις ενδομήτριες με βάση την καμπύλη ROC. Τα επίπεδα της ακτιβίνης B στον ορό παρουσίασαν επίσης θετική συσχέτιση με τον βαθμό φθαρτοποίησης του ενδομητρίου. **εικόνα 27** (Horne, et al. 2008). Τα παραπάνω δεδομένα συνέβαλαν ώστε να καταταχθεί η ακτιβίνη B, ως ένα μόριο πιθανός βιοδείκτης της λειτουργίας του ενδομητρίου (φθαρτοποίηση), το οποίο να χρήζει περαιτέρω διερεύνησης σε σχέση με την ικανότητά του να διαχωρίζει τις έκτοπες κυήσεις από τις φυσιολογικές (Cartwright, et al. 2009; Rausch and Barnhart 2012). Πέρα από τη μελέτη των Horne et al. (2008) ωστόσο, μέχρι στιγμής καμία άλλη εργασία δεν έχει ερευνήσει τα επίπεδα της ακτιβίνης B στον ορό γυναικών με έκτοπες και παλίνδρομες κυήσεις. Αξίζει να υπενθυμιστεί στο σημείο αυτό, ότι η ανίχνευση της ακτιβίνης B στον ορό, έχει παρουσιάσει μεγάλη ασυνέπεια μεταξύ των αποτελεσμάτων διαφορετικών ερευνών, η οποία οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στη χρήση διαφορετικών αντιδραστηρίων (Μέρος Β: Επίπεδα κατά τη διάρκεια του κύκλου και στην κύηση).



**Εικόνα 27** : Διαγράμματα κατανομής των επιπέδων της ακτιβίνης B στον ορό. Α) Η ακτιβίνη ήταν χαμηλότερη στις σαλπιγγικές έκτοπες κυήσεις (EP) σε σχέση με τις παλίνδρομες κυήσεις (Misc) και τις ενδομήτριες (TOP) ( $p=0.001$ ), Β) η ακτιβίνη B ήταν χαμηλότερη στις σαλπιγγικές έκτοπες κυήσεις σε σχέση με τις ενδομήτριες κυήσεις ( $p<0.005$ ). Γ) υπάρχει συσχέτιση ( $p=0.005$ , Spearman correlation) μεταξύ της ακτιβίνης B και του βαθμού φθαρτοποίησης (-, +/-, +) (Horne, et al. 2008).



Δεδομένα επίσης για την έκφραση των ακτιβινών στο ενδομήτριο υπάρχουν από την εργασία των *Prakash et al.* (2008), στην οποία συγκρίθηκαν βιοψίες ενδομητρίου (ημέρα LH+7, ανοσοϊστοχημεία) από γυναίκες που παρουσίασαν αποτυχία εμφύτευσης μετά από έναν κύκλο εξωσωματικής γονιμοποίησης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (υγιείς γόνιμες γυναίκες), όπου παρατηρήθηκε μείωση στην έκφραση της φολλιστατίνης στα κύτταρα του αδενικού επιθηλίου στις γυναίκες με αποτυχία εμφύτευσης. Η έκφραση τόσο της ακτιβίνης Α όσο και της ακτιβίνης Β, παρουσίασε μία τάση για μείωση στις γυναίκες με αποτυχία εμφύτευσης, ωστόσο η τάση αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική και συνολικά η μειωμένη έκφραση της φολλιστατίνης (πρωτεΐνη δεσμευτική των ακτιβινών) δεν οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων των ακτιβινών όπως θα ήταν αναμενόμενο, με αποτέλεσμα οι συγγραφείς να προτείνουν ότι ενδέχεται και άλλοι παράγοντες να εμπλέκονται στη ρύθμιση των ακτιβινών (*Prakash, et al.* 2008), καθώς και ότι η διαταραχή της αλληλεπίδρασης ακτιβινών και φολλιστατίνης ενδέχεται να συμβάλει στην αποτυχία της εμφύτευσης (*Florio, et al.* 2010b). Περαιτέρω, η ομάδα των *Prakash et al.* (2006), μελετώντας την έκφραση των ίδιων πρωτεϊνών (φολλιστατίνη, ακτιβίνη Α, ακτιβίνη Β) σε βιοψίες ενδομητρίου γυναικών με καθ' ἑξιν αποβολές (ημέρα LH+7, ανοσοϊστοχημεία), ανέφερε μείωση της έκφρασης της φολλιστατίνης και της ακτιβίνης Α στα κύτταρα στρώματος του ενδομητρίου, ενώ η έκφραση της ακτιβίνης Β παρουσίασε μόνο μία τάση μείωσης, η οποία δεν ήταν ωστόσο στατιστικά σημαντική. Η διαταραχή αυτή στην αλληλεπίδραση της ακτιβίνης Α και της φολλιστατίνης προτάθηκε ότι ενδέχεται να παίρνει μέρος στην μειωμένη φθαρτοποίηση και στην επικείμενη αποβολή (*Prakash, et al.* 2006).

Σε σχέση με τα επίπεδα της ακτιβίνης Α στον ορό, η ανίχνευσή της έχει δώσει αντικρουόμενα αποτελέσματα μέχρι στιγμής. Οι μεγαλύτερες σε αριθμό δειγμάτων μελέτες περιελάμβαναν γυναίκες με έκτοπη, αυτόματη αποβολή και φυσιολογική ενδομήτρια κύηση, ενώ μόνο μία μελέτη περιελάμβανε γυναίκες με έκτοπη, παλίνδρομη και φυσιολογική κύηση, και συνολικά, αν και οι περισσότερες μελέτες αναδεικνύουν την ικανότητα της ακτιβίνης Α να ξεχωρίσει τις έκτοπες από τις ενδομήτριες κυήσεις (*Refaat* 2014), μόνο δύο μελέτες έχουν αναφέρει την ικανότητα της ακτιβίνης Α να διακρίνει είτε μεταξύ έκτοπων και παλίνδρομων κυήσεων (*Daponte, et al.* 2013), είτε μεταξύ έκτοπων και αυτόματων αποβολών (*Florio, et al.* 2007b). Επιπλέον, μεγάλη διακύμανση παρατηρείται στην αναφερόμενη ευαισθησία (από 100% μέχρι 59,6%) και ειδικότητα (από 99,6% μέχρι 13%) της χρήσης της ακτιβίνης Α ως πιθανού βιοδείκτη στη διάκριση των έκτοπων κυήσεων (*Refaat* 2014). **Πίνακας 4** (*Refaat* 2014).

**Πίνακας 4 :** Χαρακτηριστικά δημοσιευμένων μελετών της διαγνωστική ικανότητας των επιπέδων της ακτιβίνης Α του ορού στη διάγνωση κυήσεων άγνωστης θέσης (PUL) , έκτοπων κυήσεων (EP) και αποβολών (AB) (*Refaat* 2014).

Research group	Publication year	Study design	Number of patients	First trimester gestational age	Cut-off value	AUC	Sensitivity	Specificity	Reference number
<b>Florio et al.</b>	2007	Prospective Observational	536 PUL	Not reported	370 pg/mL	1.00	100%	99.6%	[36]
<b>Kirk et al.</b>	2009	Prospective Observational	141 PUL	Not reported	370 pg/mL	0.51	93%	13%	[71]
<b>Florio et al.</b>	2011	Retrospective case-control	30 EP & 30 IUP	Between 6 to 8 weeks	430 pg/mL	0.99	96.7%	100%	[66]
<b>Rausch et al.</b>	2011	Retrospective cas -control	100 EP & 100 IUP	EP 45.15 ± 18.95; IUP 48.8 ± 18.34 days	376.15 pg/mL	0.78	80%	72%	[22]
<b>Warrick et al.</b>	2012	Retrospective cohort study	89 EP, 100 IUP & 100 AB	Median EP 5 weeks (1-10 weeks); AB and IUP 7 weeks (1-10 weeks)	< 260 pg/mL	0.62	59.6%	61%	[72]
<b>Roghaei et al.</b>	2012	Prospective case-control	100 EP & 100 IUP	EP 6.32 ± 1.03 weeks; IUP 6.85 ± 1.82 weeks	504 pg/mL	0.981	97%	93.5%	[69]
<b>Daponte et al.</b>	2013	Prospective case-control	30 EP, 30 AB & 33 IUP	Between 6 to 8 weeks	504 pg/mL	0.979	87.9%	100%	[67]
(AUC = area under the curve by receiver operator characteristics).									<b>2014 Refaat</b>



Η αρχική μελέτη των Florio et al.(2007), ανέφερε ότι τα επίπεδα της ακτιβίνης A ήταν σημαντικά χαμηλότερα στις έκτοπες κυήσεις, τόσο σε σχέση με τις ενδομήτριες, όσο και με τις αποβολές. Επιπλέον, οι ενδομήτριες κυήσεις είχαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα ακτιβίνης A σε σχέση με τις αποβολές. Με βάση αυτή τη διαφορετική έκφραση μεταξύ των τριών κατηγοριών, η ακτιβίνη A μπορούσε να διακρίνει μία έκτοπη κύηση σε σχέση με τις ενδομήτριες και τις αποβολές, όταν τα επίπεδά της στον ορό ήταν μεγαλύτερα από 370 pg/ml, με υψηλή ευαισθησία (100%) και ειδικότητα (99,6%) (Florio, et al. 2007b). Ακολουθώντας, επόμενες μελέτες (Daponte, et al. 2013; Florio, et al. 2011; Rausch, et al. 2011; Roghaei, et al. 2012) έδωσαν παρόμοια αποτελέσματα στην ικανότητα χρήσης των χαμηλών επιπέδων της ακτιβίνης A στις έκτοπες κυήσεις για την διάκρισή τους από τις φυσιολογικές ενδομήτριες, με διαφορετικά όμως επίπεδα της παρατηρούμενης διαχωριστικής τιμής (cut off value) (από 370-504 pg/ml), καθώς και διαφορετικά επίπεδα ευαισθησίας (97-80%) και ειδικότητας (100-72%)(Refaat 2014). Αντιθέτως, δύο μελέτες (Kirk, et al. 2009b; Warrick, et al. 2012) ανέφεραν ότι δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στις μετρούμενες τιμές της ακτιβίνης A μεταξύ των έκτοπων, αυτόματων αποβολών και φυσιολογικών κυήσεων, με αποτέλεσμα η μέτρηση της ακτιβίνης A στον ορό να μην μπορεί να διαχωρίσει μεταξύ των κατηγοριών αυτών της κύησης (Refaat 2014). **Πίνακας 4** (Refaat 2014).

Καθώς τα επίπεδα της ακτιβίνης A μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, με την παρατηρούμενη αύξησή της να ανιχνεύεται στον ορό γύρω στις έξι εβδομάδες ανάπτυξης και το αποκορύφωμά της να παρουσιάζεται στο τρίτο τρίμηνο της κύησης, είναι λογικό ότι ένα μεγάλο μέρος της ετερογένειας των αποτελεσμάτων στις παραπάνω μελέτες μπορεί να οφείλεται στην διακύμανση των εβδομάδων ανάπτυξης στα δείγματα που μελετήθηκαν (Refaat 2014). Για τον λόγο αυτό, κρίνεται σκόπιμο οι μελλοντικές έρευνες να χρησιμοποιούν στη μελέτη τους γυναίκες με παρόμοιες και συγκεκριμένες εβδομάδες ανάπτυξης, ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση των αποτελεσμάτων τους (Refaat 2014; Shaw, et al. 2012).

Επιπλέον, ακόμη και σε μελέτες με παρόμοιες εβδομάδες ανάπτυξης, διακύμανση ασφαλώς μπορεί να παρατηρείται λόγω της χρήσης διαφορετικών αντιδραστηρίων (Shaw, et al. 2012), ενώ η σύμφυτη ετερογένεια της παθοφυσιολογίας που οδηγεί στη δημιουργία των έκτοπων και των παλίνδρομων κυήσεων δυσχεραίνει περαιτέρω τη συνοχή των αποτελεσμάτων (Refaat 2014; Shaw, et al. 2012). Το γεγονός αυτό είναι καταφανές από τα διαφορετικά επίπεδα της χοριακής που έχουν αναφερθεί για τις έκτοπες κυήσεις (μπορούν να παρουσιάζουν αύξηση όπως των ενδομήτριων κυήσεων, είτε μείωση όπως των αποβολών, *Μέρος Γ: Διάγνωση, ένθετο (Barnhart 2009)*), μια παρατήρηση που έχει οδηγήσει στην πρόταση ότι μερικά τροφοβλαστικά κύτταρα μπορεί να συμπεριφέρονται όπως αυτά μιας ενδομήτριας κύησης έχοντας μεγαλύτερη λειτουργία, και άλλα να συμπεριφέρονται όπως αυτά μιας εκδράμουςας κύησης παρουσιάζοντας μειωμένη λειτουργία (Kirk, et al. 2009a; Refaat 2014).

Η διαγνωστική ικανότητα της ακτιβίνης A, θα μπορούσε επίσης να ενισχυθεί από την χρήση αντισωμάτων τα οποία να ανιχνεύουν την ελεύθερη μορφή της πρωτεΐνης και όχι αυτής που βρίσκεται δεσμευμένη με τη φολλιστατίνη (ολική ακτιβίνη), όπως συμβαίνει μέχρι σήμερα στα kit ανίχνευσης. Επιπλέον, η συνδυαστική ταυτόχρονη μέτρηση άλλων βιοδεικτών, όπως της ακτιβίνης B, του VEGF και της ινχιμπίνης, θα μπορούσε επίσης να συμβάλει στην αύξηση της ειδικότητας και της ευαισθησίας στη διάκριση των έκτοπων κυήσεων (Refaat 2014).

Ασφαλώς, η ωφέλεια που μπορεί να προκύψει από τη χρήση ενός βιοδείκτη, είτε στη διάγνωση, είτε στην πρόγνωση των έκτοπων και παλίνδρομων κυήσεων, οφείλει να εγείρει ένα καλά συντονισμένο στρατηγικό σχέδιο (ενίσχυση βασικής και κλινικής έρευνας, εφαρμογή ενιαίας ορολογίας, καλός σχεδιασμός ερευνητικών διαδικασιών-αριθμός δειγμάτων, εβδομάδες κύησης, ενιαία κοινή χρήση αντιδραστηρίων, προσεκτική ανάλυση δεδομένων),

ώστε να περιοριστούν κατά το δυνατόν οι μεταβλητές που δεν επιτρέπουν τη σύγκριση των αποτελεσμάτων και να μεγιστοποιηθεί η ικανότητα της ερευνητικής διαδικασίας να καρποφορήσει βιοδείκτες με κλινική χρήση και αξία.

### **Πιθανοί μηχανισμοί δράσης ακτιβινών**

Στην πορεία μιας φυσιολογικής κύησης, τόσο η υγεία της μητέρας, όσο και η υγεία του αναπτυσσόμενου εμβρύου δημιουργούν ένα στενά αλληλεπιδρόν σύστημα, το οποίο επιτρέπει τη διάβαση του εμβρύου μέσω της σάλπιγγας και την συγκεκριμένη χρονικά απελευθέρωσή του από τη σάλπιγγα σε ένα «συγχρονισμένο» υποδεκτικό ενδομήτριο, το οποίο στη συνέχεια επιτρέπει την εμφύτευση του εμβρύου, την δημιουργία του πλακούντα και την ομαλή ανάπτυξη της κύησης (Achache and Revel 2006; Ji, et al. 2013; Larsen, et al. 2013; Weimar, et al. 2013). Οποιαδήποτε παθολογική αλλαγή της υγιούς κατάστασης είτε από την πλευρά της μητέρας, είτε από την πλευρά του εμβρύου, δύναται να μεταβάλει τελικώς και την πορεία της κύησης. Στις έκτοπες κυήσεις σαλπιγγικής κυρίως προέλευσης, παράγοντες που επηρεάζουν την κινητικότητα των λείων μυών των σαλπίγγων, είτε των βλεφαρίδων του επιθηλίου τους, καθώς και παράγοντες που μεταβάλλουν τον εμβρυο-μητρικό διάλογο, ενδέχεται να εμπλέκονται στην παρατηρούμενη έκτοπη εμφύτευση (Ezzati, et al. 2014; Marion and Meeks 2012; Shaw, et al. 2012; Shaw and Horne 2012), ενώ στις παλίνδρομες κυήσεις μία πλειάδα παραγόντων μπορεί να εμπλέκονται, μεταξύ των οποίων και η ανεπαρκής φθαρτοποίηση του ενδομητρίου (Florio, et al. 2010b; Larsen, et al. 2013; Rai and Regan 2006).

Οι ακτιβίνες Α και Β, εκφραζόμενες τόσο από το σαλπιγγικό επιθήλιο, όσο και από τον φθαρτό του ενδομητρίου, ενδέχεται να εμπλέκονται στη δημιουργία των έκτοπων και των παλίνδρομων κυήσεων, επηρεάζοντας την κινητικότητα των σαλπίγγων, τον εμβryo-μητρικό διάλογο και τη φθαρτοποίηση του ενδομητρίου. **Πίνακας 5.**

Πίνακας 5 : Πιθανές δράσεις των ακτιβινών στην αρχόμενη κύηση

	Δράση	Αποτέλεσμα	Ακτιβίνη Α	Ακτιβίνη Β	Πηγές
Ενδομήτριο	Φθαρτοποίηση (ESCs)	επαγωγή φθαρτοποίησης γειτονικών κυττάρων	✓	✓βαθμός φθαρτοποίησης	(Horne, et al. 2008; Jones, et al. 2006c)
	μέσω MMPs		✓		(Jones, et al. 2006c).
Εμβρυο-μητρικός διάλογος	↑integrins(TB)	↓adhesion	✓		(Stoikos, et al. 2010).
	↑LIF (EECs)	↑adhesion	✓		(Florio, et al. 2010b).
	↑N cadherin (TB)	↑invasion	✓	✓	(Li, et al. 2013).
	↓E cadherin (EECs)	↑invasion	✓		(Ferreira, et al. 2008).
	↑CTB διαφοροποίηση	↑invasion	✓	✓	(Florio, et al. 2010b; Li, et al. 2013)
Σάλπιγγες	↑NOS(μακροφάγα)	↓συστολής μυών	✓		(Ezzati, et al. 2014; Phillips, et al. 2009).
	↑PGE(μακροφάγα)	↑συστολής μυών	✓		(Ezzati, et al. 2014; Phillips, et al. 2009).
	(παρουσία φλεγμονής) Διαταραχή επιδιόρθωσης ιστού μέσω MMPs		✓		(Shaw, et al. 2010).
	Σημείο εμφύτευσης	Δεν επηρεάζεται	✓	✓	(Refaat, et al. 2012).

Σε σχέση με τις σάλπιγγες και πιο συγκεκριμένα με την κινητικότητα των λείων μυών και την δραστηριότητα των βλεφαρίδων του επιθηλίου τους [Μέρος Β:Σάλπιγγες], δεν υπάρχουν άμεσα δεδομένα που να εμπλέκουν τις ακτιβίνες στη διαδικασία αυτή. Ωστόσο, η ταυτόχρονη ανίχνευση της ακτιβίνης Α σε υψηλά επίπεδα, μαζί με τα αυξημένα επίπεδα της συνθάσης του νιτρικού οξειδίου (iNOS) σε βιοψίες σαλπίγγων έκτοπων κυήσεων (Refaat 2014; Refaat, et al. 2009), καθώς και η ικανότητα της ακτιβίνης Α να επάγει την συνθάση του NO (NOS) και την προσταγλανδίνη Ε (PGE) σε μακροφάγα (Phillips, et al. 2009; Refaat 2014), δημιουργούν την υποψία ότι η ακτιβίνη Α μπορεί να επηρεάζει την κινητικότητα των λείων μυών και των βλεφαρίδων των σαλπίγγων (Refaat 2014; Shaw, et al. 2010). Εάν η ακτιβίνη Β μπορεί να επάγει την συνθάση του νιτρικού οξειδίου ή των προσταγλανδινών στα μακροφάγα δεν είναι γνωστό (ώστε να υποθεθεί παρόμοια δράση με την ακτιβίνη Α), και περαιτέρω η έκφραση της πρωτεΐνης αυτής στις βιοψίες των ιστών από έκτοπες κυήσεις, τόσο στην παρουσία όσο και στην απουσία λοίμωξης από *Chlamydia trachomatis*, δεν βρέθηκε να είναι αλλαγμένη σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Refaat 2014; Refaat, et al. 2009), γεγονός που υποδηλώνει ότι η ακτιβίνη Β ενδέχεται να μην εμπλέκεται στην σαλπιγγική προέλευσης έκτοπη κύηση, τουλάχιστον όχι μέσω της τοπικής έκφρασής της στο επίπεδο του επιθηλίου των σαλπίγγων.

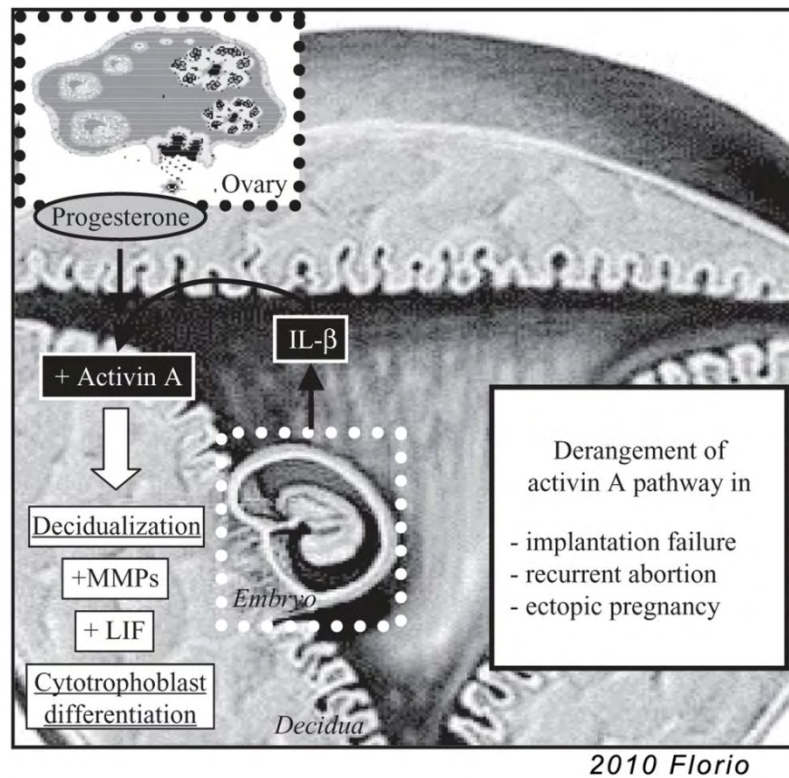
Επιπλέον, αν και η έκφραση της ακτιβίνης Α στις σάλπιγγες βιοψιών έκτοπων κυήσεων δεν βρέθηκε να συσχετίζεται με το σημείο της εμφύτευσης της κύησης (Refaat, et al. 2012), οι Shaw et al.(2010) έχουν προτείνει ότι η ακτιβίνη Α, ενδέχεται να εμπλέκεται, όταν ενυπάρχει χλαμυδιακή φλεγμονή στις σάλπιγγες, στη διαταραγμένη αναδιάρθρωση του ιστού του επιθηλίου των σαλπίγγων, μέσω της επαγωγής των μεταλλο-πρωτεασών MMPs, συμβάλλοντας ενδεχομένως με αυτόν τον τρόπο στη διαταραχή του περιβάλλοντος των σαλπίγγων (Shaw, et al. 2010).

Σε σχέση με τον εμβryo-μητρικό διάλογο [*Μέρος Β: Ρύθμιση τροφοβλάστης*], ο οποίος διαμεσολαβείται μέσω μιας πλειάδας παραγόντων, όπως οι ιντερλευκίνες, οι κυττοκίνες, οι αναπτυξιακοί παράγοντες, τα μόρια κυτταρικής προσκόλλησης και οι ορμόνες που επηρεάζουν με τη σειρά τους την πορεία της εμφύτευσης του αναπτυσσόμενου εμβρύου και της υποδεκτικότητας του ενδομητρίου (Aplin and Kimber 2004; Cavagna and Mantese 2003), η ακτιβίνη Α έχει αναφερθεί να μειώνει *in vitro* την έκφραση των ιντεγκρινών στα κύτταρα της τροφοβλάστης, μειώνοντας έτσι την ικανότητα προσκόλλησης (Stoikos, et al. 2010), ενώ ταυτόχρονα έχει αναφερθεί επίσης να επάγει στα επιθηλιακά κύτταρα του ενδομητρίου (EECs) την έκφραση της κυττοκίνης LIF, η οποία είναι απαραίτητη τόσο για την προσκόλληση, όσο και για την εμφύτευση της τροφοβλάστης (Florio, et al. 2010b; Perrier d'Hauterive, et al. 2005; Salleh and Giribabu 2014). Πέραν του σταδίου αυτού, η επικείμενη εισβολή της τροφοβλάστης στον φθαρτό του ενδομητρίου επηρεάζεται επίσης από τον εμβryo-μητρικό διάλογο, και οι ακτιβίνη Α, έχει αναφερθεί να επάγει *in vitro* τη διαφοροποίηση της κυτταροτροφοβλάστης σε διεισδυτικού τύπου εξωλαχνική τροφοβλάστη (iEVT), επάγοντας την έκκριση της MMP-2 στα κύτταρα της τροφοβλάστης, αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο τη διεισδυτική τους ικανότητα (Jones, et al. 2006c), ενώ περαιτέρω τόσο η ακτιβίνη Α όσο και η ακτιβίνη Β, έχουν αναφερθεί να αυξάνουν την έκφραση της Ν καντχερίνης στα κύτταρα της τροφοβλάστης, αυξάνοντας έτσι την ικανότητα διεισδυσής της (Li, et al. 2013). Ταυτόχρονα, η ακτιβίνη Α ενδέχεται να επηρεάζει επίσης και την διεισδυτική ικανότητα των κυττάρων του στρώματος του ενδομητρίου (ESCs), είτε δρώντας αυξάνοντας πιθανόν την έκκριση των MMPs, είτε και μειώνοντας την έκφραση της Ε καντχερίνης (E cadherin) όπως έχει αναφερθεί να επάγει στα κύτταρα του επιθηλίου του ενδομητρίου (EECs)(Ferreira, et al. 2008; Gellersen, et al. 2010).

Σε σχέση με τη φθαρτοποίηση του ενδομητρίου [*Μέρος Β: Φθαρτοποίηση ενδομητρίου*], τόσο η ακτιβίνη Α όσο και η ακτιβίνη Β έχουν αυξημένη έκφραση κατά τη φθαρτοποίηση του ενδομητρίου, με την ακτιβίνη Α να σχετίζεται περαιτέρω θετικά και με το πάχος του ενδομητρίου, ενώ η ακτιβίνη Β να σχετίζεται θετικά με το βαθμό φθαρτοποίησης (Florio, et al. 2010b; Horne, et al. 2008; Jones, et al. 2002; Jones, et al. 2006c). Η ακτιβίνη Α έχει προταθεί επίσης ως ένας παράγοντας επαγωγής της φθαρτοποίησης των κυττάρων του στρώματος του ενδομητρίου, μέσω της επαγωγής της έκφρασης της μεταλλο-πρωτεάσης MMP-2 (Jones, et al. 2006a; Jones, et al. 2006b; Jones, et al. 2006c). Δεδομένα από βιοψίες ενδομητρίου, όπου παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση της ακτιβίνης Α και της φολλιστατίνης σε γυναίκες με καθ'έξιν αποβολές, περαιτέρω αναδεικνύουν το συσχετισμό της ακτιβίνης Α με την επαγωγή της φθαρτοποίησης (Prakash, et al. 2006). Επιπλέον η σχέση των ακτιβινών με τη φθαρτοποίηση του ενδομητρίου μαρτυρείται επίσης από τα μειωμένα επίπεδα τόσο της ακτιβίνης Α όσο και της ακτιβίνης Β, στον ορό γυναικών με έκτοπο και παλίνδρομη κύηση σε σχέση με γυναίκες με φυσιολογική ενδομήτρια κύηση (Horne, et al. 2008; Refaat 2014).

Οι Florio et.al. (2010) συνδυάζοντας παράγοντες που είναι απαραίτητοι για την αρχόμενη κύηση, όπως η ιντερλευκίνη 1β παραγόμενη από το έμβryo και η προγεστερόνη παραγόμενη από την ωοθήκη, καθώς και της επαγωγικής δράσης αυτών των παραγόντων στην έκκριση της ακτιβίνης Α από τα κύτταρα του ενδομητρίου, πρότειναν την ακτιβίνη Α ως ένα μόριο εμπλεκόμενο στον εμβryo-μητρικό διάλογο, το οποίο καθορίζει την πορεία της

φθαρτοποίησης, την επαγωγή των μεταλλο-πρωτεασών και του LIF στα κύτταρα του ενδομητρίου καθώς και της διαφοροποίησης της κυτταροτροφοβλάστης, με την διαταραχή του μονοπατιού της ακτιβίνης A να μπορεί να οδηγή στην αποτυχία της εμφύτευσης, τις καθ'έξιν αποβολές και την έκτοπο κύηση, **εικόνα 28** (Florio, et al. 2010b). Η εμπλοκή της ακτιβίνης B στο σχήμα αυτό, περιλαμβάνεται στην πιθανή συμμετοχή της στην φθαρτοποίηση (Horne, et al. 2008) καθώς και στην διαφοροποίηση της κυτταροτροφοβλάστης (Li, et al. 2013), ενώ παραμένει άγνωστο μέχρι στιγμής εάν μπορεί να επαχθεί από την προγεστερόνη και την IL-1 $\beta$ , καθώς και εάν μπορεί να επάγει η ίδια τις μεταλλο-πρωτεάσες MMPs και την κυττοκίνη LIF.



**Εικόνα 28 :** Βιολογικές δράσεις της ακτιβίνης A στο ανθρώπινο ενδομήτριο κατά την προεμφυτευτική φάση και την αρχόμενη εγκυμοσύνη. IL, interleukin, MMPs, matrix metalloproteinases, (Florio, et al. 2010b).

### **Σκοπός της διπλωματικής εργασίας**

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν:

- α) η μέτρηση των επιπέδων της ακτιβίνης Β σε ορό γυναικών με έκτοπες, παλίνδρομες και φυσιολογικές ενδομήτριες κυήσεις, και
- β) η διερεύνηση κατά πόσον η ακτιβίνη Β μπορεί να θεωρηθεί ως ένας βιοδείκτης για τον διαχωρισμό μεταξύ έκτοπων, παλίνδρομων και φυσιολογικών κυήσεων.

## Μέρος Δ

### Υλικά και μεθοδολογία

#### Δείγματα

Η εργασία περιελάμβανε την αναδρομική μελέτη συνολικά 35 δειγμάτων ορού από γυναίκες με εκδράμους κυήσεις, με ήπια συμπτώματα κοιλιακού πόνου και κοιλιακής αιμόρροιας, μεταξύ 6<sup>ης</sup>-8<sup>ης</sup> εβδομάδας ανάπτυξης, οι οποίες εισήχθησαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας, μεταξύ του χρονικού διαστήματος από τον Ιανουάριο του 2010 μέχρι και τον Δεκέμβριο του 2012. Τα δείγματα ορού συλλέχτηκαν στην αρχική επίσκεψη πριν από τη θεραπευτική παρέμβαση, μέρος όλων των δειγμάτων αναλύθηκε για τον προσδιορισμό της β-χοριακής και της προγεστερόνης και το υπόλοιπο αποθηκεύτηκε στους -80°C μέχρι και την ημέρα της μέτρησης της ακτιβίνης Β. Από τις 35 γυναίκες με εκδράμους κύηση, 18 είχαν έκτοπη κύηση (ΕΡ, ομάδα 1) και 17 παλίνδρομη κύηση (ΜΑ, ομάδα 2). Η διάγνωση των κυήσεων βασίστηκε στην εκτίμηση της κλινικής εξέτασης και των υπερηχογραφικών ευρημάτων. Ως ομάδα ελέγχου, μελετήθηκαν δείγματα ορού από 13 γυναίκες με υγιή ενδομήτρια κύηση (ΙΥΡ, ομάδα 3), 6<sup>ης</sup>-8<sup>ης</sup> εβδομάδας ανάπτυξης, οι οποίες εισήχθησαν για θεραπευτικό τερματισμό της κύησης, στο χρονικό διάστημα μεταξύ Ιανουαρίου του 2011 και Ιουλίου 2015.

#### Μέτρηση ELISA.

Η συγκέντρωση της ακτιβίνης Β προσδιορίστηκε στα δείγματα ορού με την τεχνική της ανταγωνιστικής διπλής ELISA (CSB-E11803h, Cusabio Biotech). Το πιάτο της ανίχνευσης φέρει επίστρωση με goat-anti-rabbit αντίσωμα. Προσθέτονται τα δείγματα ορού μαζί με το ειδικό για την inhbb αντίσωμα και την υπεροξειδάση (HRP)-συνδεδεμένη με inhbb. Η αντίδραση ανταγωνιστικού αποκλεισμού ξεκινά μεταξύ της συνδεδεμένης με την HRP-inhbb και της μη-συνδεδεμένης inhbb για το αντίσωμα. Το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης προστίθεται στη συνέχεια και το χρώμα που προκύπτει είναι αντιστρόφως ανάλογο με την ποσότητα της inhbb στο δείγμα. Η οπτική πυκνότητα μετράται στα 450nm και στα 630nm για διόρθωση (Enspire multimode plate reader, Perkin Elmer). Οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν εις τριπλούν και ο μέσος όρος χρησιμοποιήθηκε για το τελικό αποτέλεσμα. Ο προσδιορισμός της πρότυπης καμπύλης έγινε με το προτεινόμενο λογισμικό Curve expert 1.4. Το kit αυτό έχει εύρος ανίχνευσης της ακτιβίνης Β: 2-400pg/ml, υψηλή ευαισθησία, ειδικότητα και ακρίβεια (intra assay precision CV<15%, inter assay precision CV<15%).

#### Στατιστική ανάλυση.

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό SPSS 20(IBM). Η τιμή  $p<0.05$  θεωρήθηκε ως στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα. Για να προσδιοριστεί ο τρόπος σύγκρισης των μετρήσεων (ακτιβίνη, χοριακή, προγεστερόνη), ελέγχθηκε η κανονικότητα της κατανομής τους με το τεστ Shapiro. Εφόσον οι κατανομές των μετρήσεων δεν παρουσίαζαν κανονικότητα στην κατανομή τους, ο μη-παραμετρικός έλεγχος Kruskal Wallis έγινε για τη σύγκριση μεταξύ των τριών ομάδων (έκτοπες, παλίνδρομες, φυσιολογικές) και ο μη-παραμετρικός ad hoc έλεγχος Mann Whitney U έγινε για τη σύγκριση περαιτέρω μεταξύ των ομάδων ανά δύο. Ο συσχετισμός μεταξύ των μετρήσεων (ακτιβίνη, χοριακή, προγεστερόνη) έγινε με το τεστ Spearman( $\rho$ ). Η ανάλυση ROC έγινε για να προσδιοριστούν οι ιδιότητες της ευαισθησίας και της ειδικότητας της ακτιβίνης Β να ξεχωρίζει την ασθένεια (έκτοπη, παλίνδρομη κύηση) σε σχέση με την φυσιολογική ενδομήτρια κύηση, όπου με βάση την περιοχή κάτω από την καμπύλη AUC, επιλέχθηκε η διαχωριστική τιμή (cut off value).

## Μέρος Ε

### Αποτελέσματα

Προσδιορισμός κανονικότητας κατανομής, τεστ *Shapiro*. Οι τιμές της ακτιβίνης Β, της χοριακής ΗCG και της προγεστερόνης P4 δεν παρουσίασαν κανονική κατανομή ( $p=0.006$ ,  $p<0.000$ ,  $p<0.000$ , αντίστοιχα).

Μετρήσεις ακτιβίνης Β. Η πρότυπη καμπύλη συγκέντρωσης και οπτικής πυκνότητας για δείγματα γνωστής συγκέντρωσης (**εικόνα 29**), χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της άγνωστης συγκέντρωσης των δειγμάτων ορού με βάση την οπτική πυκνότητά τους, σύμφωνα με την εξίσωση που προέκυψε από το λογισμικό Curve expert 1.4.

$$y=(a+bx)/(1+cx+dx^2),$$

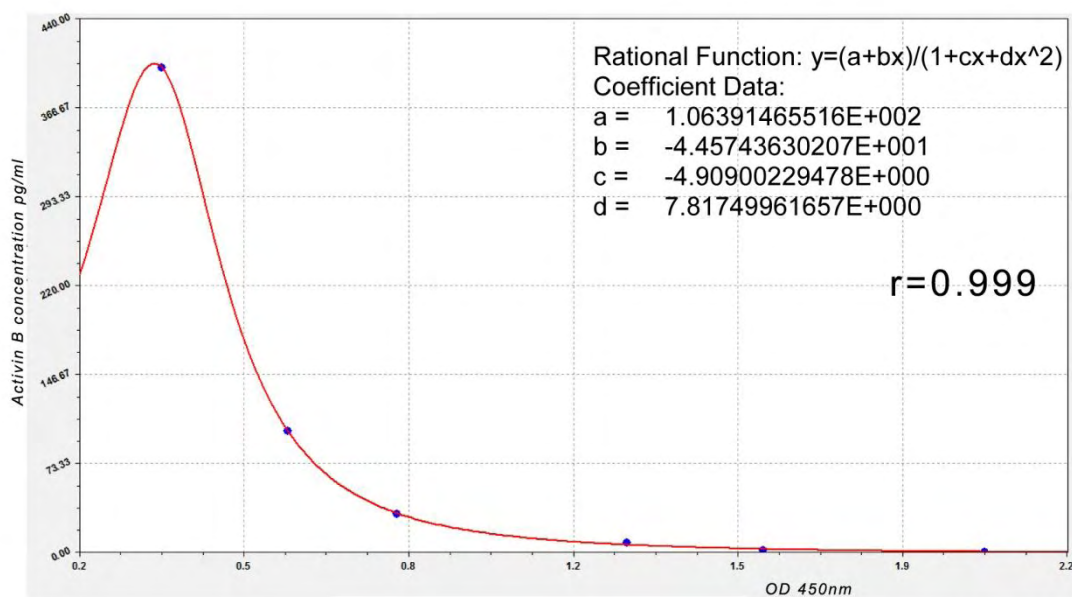
$$a=1.06391465516E+002$$

$$b=-4.45743630207E+001$$

$$c=-4.90900229478E+000$$

$$d=7.81749961657E+000$$

$$r=0.999$$



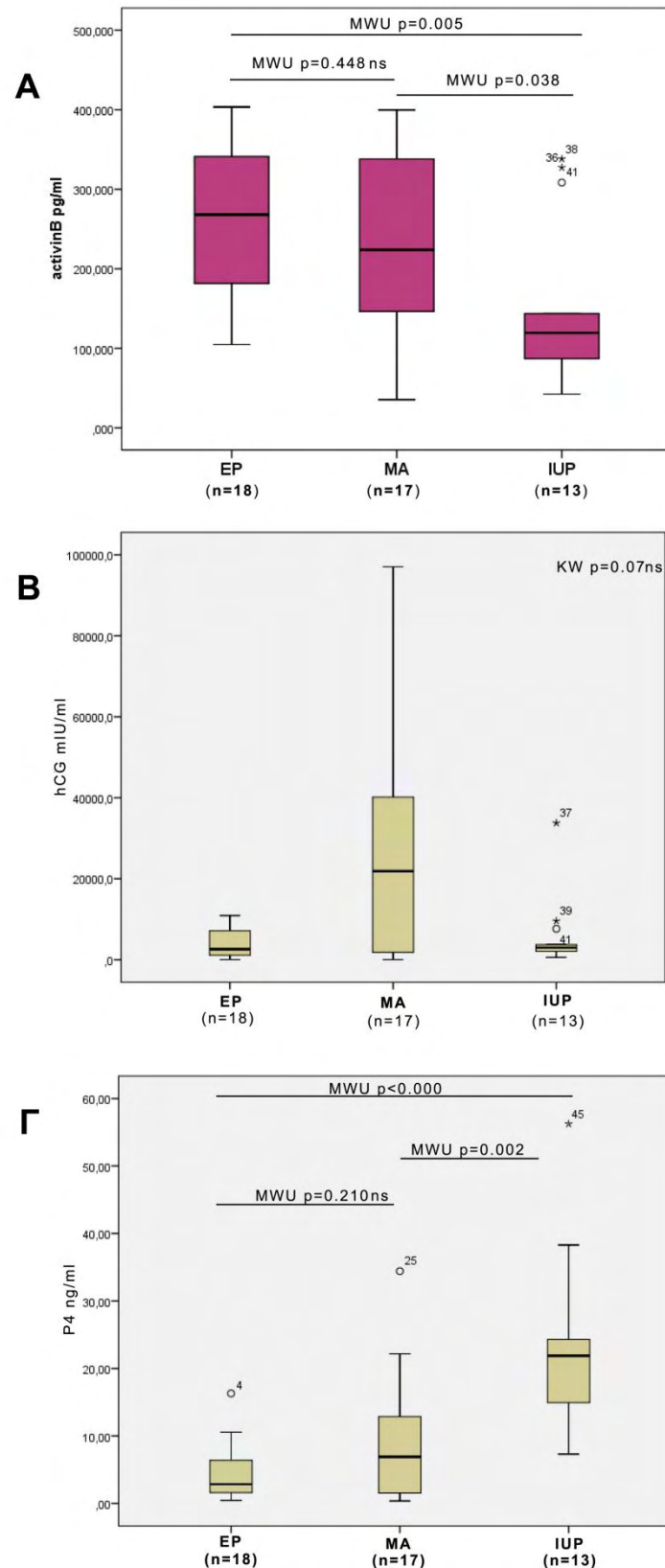
Curve expert 1.4

**Εικόνα 29** : πρότυπη καμπύλη δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης ακτιβίνης Β (pg/ml), σε σχέση με την οπτική πυκνότητα στα 450nm (διορθωμένη για την οπτική πυκνότητα 630nm), με βάση το λογισμικό Curve Expert 1.4.

Η εικόνα της κατανομής (boxplot) της συγκέντρωσης της ακτιβίνης Β για κάθε ομάδα γυναικών, όπως προέκυψε μετά τη χρήση της πρότυπης καμπύλης φαίνεται στην **εικόνα 30**, όπου απεικονίζεται η διάμεσος (median) μέσα στο κουτί, οι μέγιστες και ελάχιστες τιμές (whiskers), καθώς και τα outliers. Το IQR (interquartile range, Q3-Q1, 75% με 25%) αποτελεί το μέτρο διασποράς.

Οι τιμές των παρατηρήσεων για την ακτιβίνη Β σε κάθε ομάδα γυναικών παρουσιάζονται στον **πίνακα 6**. Οι διάμεσες τιμές της συγκέντρωσης της ακτιβίνης Β μεταξύ των τριών ομάδων γυναικών (έκτοπη, παλίνδρομη, φυσιολογική κύηση), βρέθηκαν να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (KW  $p=0.01$ ).





**Εικόνα 30 :** Διαγράμματα κατανομής (boxplot) για τις διάμεσες τιμές Α) της ακτιβίνης Β, Β) της χοριακής και Γ) της προγεστερόνης. Όπου KW, Kruskal Wallis test, MWU, Mann Whitney U test, EP, έκτοπη κύηση, MA, παλίνδρομη κύηση, IUP, ενδομήτρια κύηση, ns, not significant.

Οι γυναίκες με έκτοπη κύηση είχαν διάμεση τιμή συγκέντρωσης ακτιβίνης B 268 pg/ml (172 IQR), η οποία δε διέφερε στατιστικά σημαντικά (MWU  $p=0.448$ ) σε σχέση με τη διάμεση τιμή των γυναικών με παλίνδρομο κύηση (224 pg/ml, 218 IQR), ήταν όμως στατιστικά σημαντικά υψηλότερη στις γυναίκες με έκτοπη κύηση (MWU  $p=0.005$ ) σε σχέση με τη διάμεση τιμή συγκέντρωσης της ακτιβίνης B στις γυναίκες με φυσιολογική ενδομήτρια κύηση (119pg/ml, 141 IQR). Επίσης, η διάμεση τιμή της ακτιβίνης B στις γυναίκες με παλίνδρομη κύηση 224pg/ml (218 IQR) ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη (MWU  $p=0.038$ ) σε σχέση με τις γυναίκες με ενδομήτριες κυήσεις 119pg/ml (141 IQR).

**Πίνακας 6 :** Διάμεσες τιμές και IQR για την ακτιβίνη B, τη χοριακή και την προγεστερόνη. Όπου EP, έκτοπος κύηση, MA, παλίνδρομος κύηση, IUP, ενδομήτρια κύηση (ομάδα ελέγχου), KW, Kruskal Wallis test, MWU, Mann Whitney U test, ns, not statistical significant.

	Median (IQR)			KW	MWU		
	EP	MA	IUP		EP vs MA	MA vs IUP	EP vs IUP
<b>Activin B</b>	<b>268</b> (178)	<b>224</b> (218)	<b>119</b> (141)	$p=0.01$	$p=0.4ns$	$p=0.038$	$p=0.005$
hCG	2608 (6585)	21855 (39317)	2975 (3657)	$p=0.07ns$	$p=0.03$	$p=0.13ns$	$p=0.47ns$
P4	2.84 (5.79)	6.91 (12.79)	21.8 (12.38)	$p<0.000$	$p=0.2ns$	$p=0.002$	$p<0.000$

**Μετρήσεις χοριακής HCG.** Η κατανομή των τιμών της χοριακής για κάθε ομάδα γυναικών φαίνεται στην **εικόνα 30** και οι διάμεσες τιμές παρουσιάζονται αντίστοιχα στον **πίνακα 6**. Οι τιμές της χοριακής δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των τριών ομάδων γυναικών (KW  $p=0.07$ ). Οι γυναίκες με έκτοπη κύηση είχαν διάμεση τιμή χοριακής 2608 mIU/ml (6585 IQR), με παλίνδρομη κύηση 21855 mIU/mL (39317 IQR), και με φυσιολογική κύηση 2975 mIU/ml (3657 IQR).

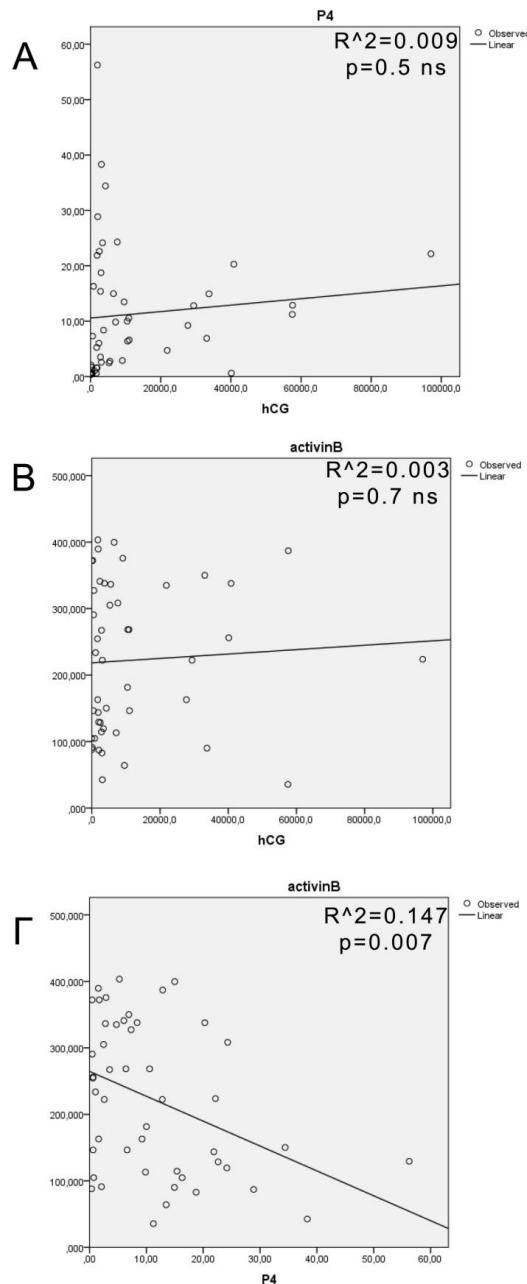
**Μετρήσεις προγεστερόνης P4.** Η κατανομή των τιμών της προγεστερόνης για κάθε ομάδα γυναικών παρουσιάζεται στην **εικόνα 30** και οι διάμεσες τιμές αντίστοιχα στον **πίνακα 6**. Οι τιμές της προγεστερόνης παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών ομάδων γυναικών (KW  $p<0.000$ ). Η διάμεση τιμή προγεστερόνης για την ομάδα των έκτοπων κυήσεων ήταν 2.84 ng/ml (5.8 IQR), η οποία δε διέφερε στατιστικά (MWU  $p=0.2$ ) σε σχέση με τις παλίνδρομες κυήσεις 6.91 ng/ml (12.8 IQR), ήταν όμως στατικά σημαντικά χαμηλότερη (MWU  $p<0.000$ ) στις γυναίκες με έκτοπη κύηση σε σχέση με τις γυναίκες που είχαν φυσιολογική ενδομήτρια κύηση 21.8 ng/ml (12.9 IQR). Οι τιμές της προγεστερόνης διέφεραν επίσης στατιστικά σημαντικά (MWU  $p=0.002$ ) και μεταξύ των γυναικών με παλίνδρομες κυήσεις (6.91ng/ml), όπου ήταν χαμηλότερες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (φυσιολογικές ενδομήτριες κυήσεις, 21.8ng/ml).

**Συσχέτιση ακτιβίνης B και ορμονών (HCG, P4).** Οι τιμές της χοριακής και της προγεστερόνης παρουσίασαν μικρή στατιστικά σημαντική συσχέτιση (correlation) μεταξύ τους ( $p=0.411$ ,  $p=0.004$ ), η οποία στην περαιτέρω διερεύνηση σε κάθε ομάδα κύησης παρέμεινε στατιστικά σημαντική μόνο στις έκτοπες ( $p=0.637$ ,  $p=0.004$ ) και στις παλίνδρομες κυήσεις ( $p=0.591$ ,  $p=0.013$ ). Η ανάλυση της γραμμικής παλινδρόμησης (linear regression) για την χοριακή και την προγεστερόνη ( $R^2=0.009$ ,  $p=0.513$ , όχι στατιστικά σημαντική) παρουσιάζεται στην **εικόνα 31**.

Οι τιμές της ακτιβίνης B δεν παρουσίασαν συσχέτιση με τη χοριακή ( $p=0.084$ ,  $p=0.5$ ). Η περαιτέρω ανάλυση σε κάθε κατηγορία κύησης (έκτοπες, παλίνδρομες, φυσιολογικές κυήσεις)

δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της ακτιβίνης B και της χοριακής (δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Η ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης ( $R^2=0.003$ ,  $p=0.7$ , όχι σημαντική στατιστικά). της ακτιβίνης B σε σχέση με τη χοριακή παρουσιάζεται στην **εικόνα 31**.

Οι τιμές της ακτιβίνης B παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μικρή συσχέτιση με τις τιμές της προγεστερόνης, ( $\rho=-0.327$ ,  $p=0.02$ ). Η περαιτέρω ανάλυση σε κάθε κατηγορία κύησης (έκτοπες, παλίνδρομες, φυσιολογικές κυήσεις) δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της ακτιβίνης B και της προγεστερόνης (δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Η ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης ( $R^2=0.147$ ,  $p=0.007$ , σημαντική στατιστικά) για την ακτιβίνη B και την προγεστερόνη παρουσιάζεται στην **εικόνα 31**.



**Εικόνα 31 :** Διαγράμματα ανάλυσης γραμμικής παλινδρόμησης για τις τιμές Α) χοριακής και προγεστερόνης ( $n=48$ ), Β) ακτιβίνης B και χοριακής ( $n=48$ ), και Γ) ακτιβίνης B και προγεστερόνης ( $n=48$ ). Όπου ns, not significant.

**Διαγνωστική ικανότητα ακτιβίνης Β.** Οι τιμές της ακτιβίνης Β χρησιμοποιήθηκαν στην ROC ανάλυση προκειμένου να προσδιοριστεί η ευαισθησία και η ειδικότητα της ακτιβίνης να διαχωρίζει την πάθηση (έκτοπη, παλίνδρομη κύηση) σε σχέση με τις φυσιολογικές ενδομήτριες κυήσεις. Το σύνολο των AUC που προέκυψαν παρουσιάζονται στον **Πίνακα 7**.

Η ακτιβίνη Β μπορούσε να διακρίνει μία έκτοπη κύηση από μία φυσιολογική ενδομήτρια, με ευαισθησία 88.9% και ειδικότητα 76.9%, και AUC=0.799, ( $p=0.005$ , στατιστικά σημαντικό), όταν η συγκέντρωσή της ήταν πάνω από τη διαχωριστική τιμή των 145 pg/ml.

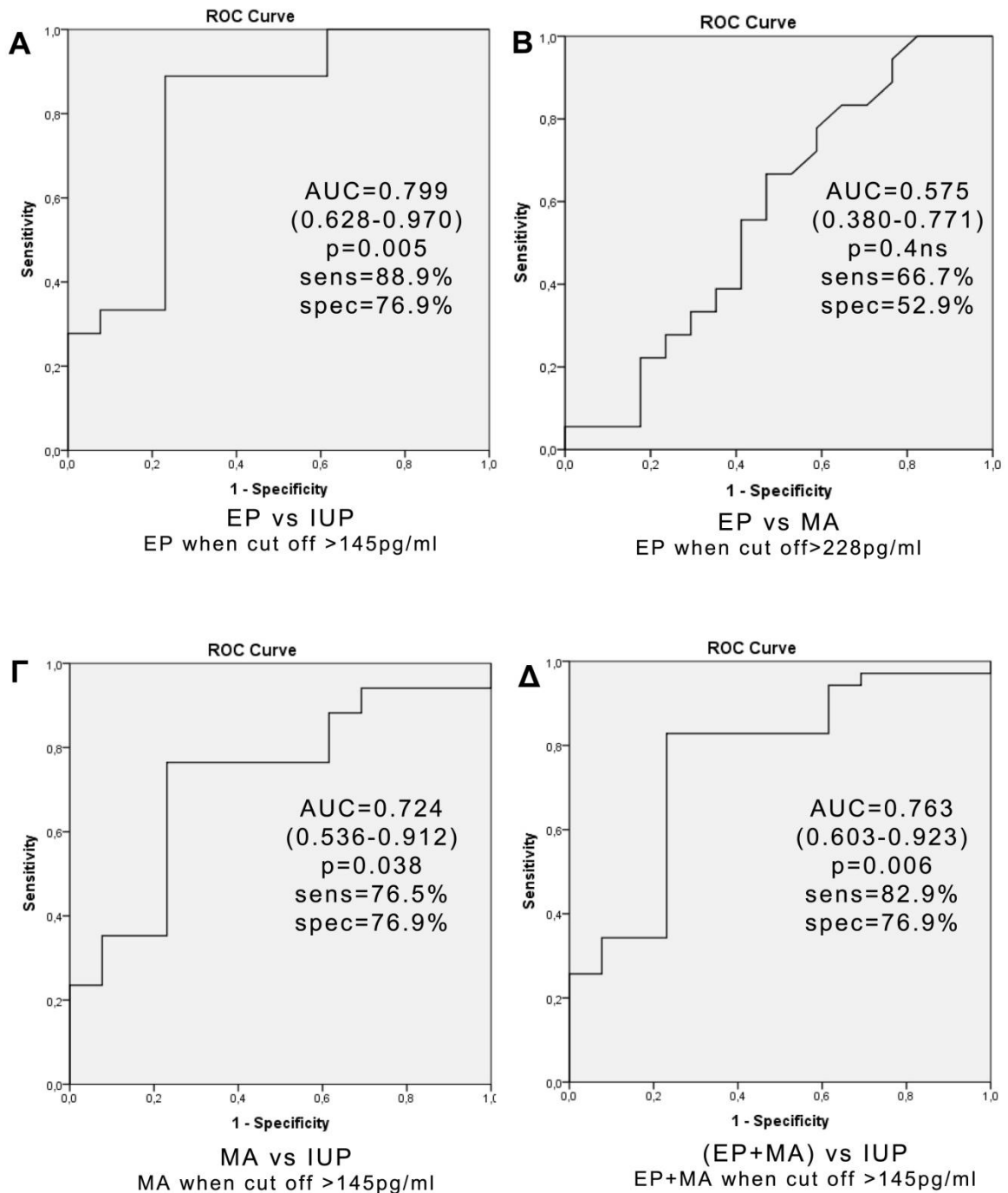
Η ακτιβίνη Β μπορούσε επίσης να διακρίνει μία παλίνδρομη κύηση από μία φυσιολογική ενδομήτρια, με ευαισθησία 76.5% και ειδικότητα 76.9%, ( $p=0.038$ , στατιστικά σημαντικό), όταν η συγκέντρωσή της ήταν πάνω από τη διαχωριστική τιμή των 228pg/ml.

Σε σχέση ωστόσο με τον διαχωρισμό παλίνδρομων και έκτοπων κυήσεων, η ακτιβίνη δεν μπορούσε να διακρίνει μεταξύ των δύο καταστάσεων (AUC=0.575,  $p=0.448$ , όχι στατιστικά σημαντικό).

Επιπλέον, συνολικά η ακτιβίνη Β μπορούσε να διακρίνει μία εκδράμουςα κύηση (έκτοπες και παλίνδρομες) από μία φυσιολογική ενδομήτρια κύηση, με ευαισθησία 82.9% και ειδικότητα 76.9%, και AUC=0.763 ( $p=0.006$  στατιστικά σημαντικό), όταν η τιμή της ήταν πάνω από τη διαχωριστική τιμή των 145pg/ml. **Εικόνα 32.**

**Πίνακας 7 :** Ευαισθησία (*sens*) και ειδικότητα (*spec*) για την ακτιβίνη Β, ως βιοδείκτης του ορού αίματος για τον διαχωρισμό μεταξύ έκτοπων (EP), παλίνδρομων (MA), και φυσιολογικών ενδομήτριων κυήσεων (IUP). Όπου AUC, area under the curve, cut off value, διαχωριστική τιμή, ns, not statistical significant.

	AUC(CI 95%)	Cut off value	sens	spec	p value
EP vs IUP	0.799 (0.628-0.970)	>145.07pg/ml	0.889	0.769	0.005
EP vs MA	0.575 (0.380-0.771)	>228pg/ml	0.667	0.529	0.4ns
MA vs IUP	0.724 (0.536-0.912)	>145.07pg/ml	0.765	0.769	0.038
EP+MA vs IUP	0.763 (0.603-0.923)	>145pg/ml	0.829	0.769	0.006



**Εικόνα 32** : Καμπύλες ROC για την ευαισθησία (sens) και την ειδικότητα (spec) της ακτιβίνης B να διαχωρίζει Α) τις έκτοπες κυήσεις σε σχέση με τις φυσιολογικές ενδομήτριες και Β) τις έκτοπες σε σχέση με τις παλίνδρομες κυήσεις, Γ) τις παλίνδρομες σε σχέση με τις φυσιολογικές ενδομήτριες και Δ) τις εκδράμους κυήσεις (έκτοπες και παλίνδρομες) σε σχέση με τις φυσιολογικές ενδομήτριες. Όπου AUC, area under the curve, cut off value, διαχωριστική τιμή, ns, not significant.

## Μέρος ΣΤ

### Συμπεράσματα

Οι ακτιβίνες είναι πολύ-λειτουργικές πρωτεΐνες, οι οποίες σε συνδυασμό με τις ινχιμπίνες και τη φολλιστατίνη δημιουργούν ένα στενά ρυθμιζόμενο αλληλεπιδρόν σύστημα, το οποίο σε κυτταρικό επίπεδο ρυθμίζει την κυτταρική διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση (Hedger and de Kretser 2013; Xia and Schneyer 2009). Στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα, οι ακτιβίνες είναι περισσότερο γνωστές για την επαγωγή της έκκρισης της FSH από τα κύτταρα της υπόφυσης, ενώ η έκφραση των ακτιβινών από τον φθαυτό του ενδομητρίου, όπως και από το επιθήλιο των σαλπίγγων, τις έχει περαιτέρω εμπλέξει και στη διαδικασία του εμβryo-μητρικού διαλόγου κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης και της εισβολής της τροφοβλάστης (Jones, et al. 2006c; Refaat 2014). Τα παραπάνω δεδομένα σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα επίπεδα της ακτιβίνης A, ανιχνεύονται στον ορό γυναικών από την 6<sup>η</sup> εβδομάδα ανάπτυξης και αυξάνονται μέχρι και το τέλος του τρίτου τριμήνου της κύησης, οδήγησαν στην διερεύνηση των επιπέδων της ακτιβίνης A σε περιπτώσεις έκτοπων κυήσεων σε σχέση με τα επίπεδά της στις φυσιολογικές ενδομήτριες κυήσεις, με αντικρουόμενα μέχρι στιγμής αποτελέσματα ως προς την ικανότητα της ακτιβίνης A να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένας βιοδείκτης διαχωρισμού των καταστάσεων αυτών (Refaat 2014).

Στην προσπάθεια ανεύρεσης νέων πιθανών βιοδεικτών, οι Horne et al. (2008) συνέκριναν τη γονιδιωματική έκφραση σε ιστούς βιοψιών ενδομητρίου έκτοπων (n=11) και φυσιολογικών ενδομήτριων κυήσεων (n=14), όπου ανέδειξαν την χαμηλότερη έκφραση της ακτιβίνης B στο φθατό των έκτοπων κυήσεων σε σχέση με τις φυσιολογικές ενδομήτριες κυήσεις. Η μελέτη αυτή περαιτέρω κατέδειξε ότι τα επίπεδα της έκφρασης της ακτιβίνης B σχετίζονται θετικά με τον βαθμό της φθατοποίησης του ενδομητρίου σε δείγματα βιοψιών έκτοπων (n=11), παλίνδρομων (n=6) και φυσιολογικών ενδομήτριων κυήσεων (n=8), καθώς και ότι η ακτιβίνη B αυξάνεται, έχοντας χρονική εξάρτηση, κατά την επαγωγή της φθατοποίησης κυτάρων στρώματος ενδομητρίου *in vitro*. Επιπλέον η μέτρηση των επιπέδων της ακτιβίνης B σε δείγματα ορού βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη στις γυναίκες με έκτοπη κύηση σε σχέση με τις φυσιολογικές ενδομήτριες κυήσεις, η οποία επίσης συσχετίστηκε θετικά με τον βαθμό φθατοποίησης του ενδομητρίου (Horne, et al. 2008). Τα παραπάνω δεδομένα συνετέλεσαν ώστε να χαρακτηριστεί η ακτιβίνη B ως ένας νέος πιθανός βιοδείκτης της λειτουργίας του ενδομητρίου, καλώντας για περαιτέρω έρευνα (Cartwright, et al. 2009; Rausch and Barnhart 2012).

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μελέτη σε δείγματα ορού γυναικών με έκτοπη (n=18), παλίνδρομη (n=17) και φυσιολογική κύηση (n=13), με στόχο να διευκρινιστεί εάν η ακτιβίνη B μπορούσε να ανιχνευτεί στον ορό των γυναικών αυτών και στην συνέχεια να προσδιοριστεί εάν η ακτιβίνη B μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης στη διάκριση των καταστάσεων αυτών. Τα αποτελέσματα της έρευνας κατέδειξαν ότι τα επίπεδα της ακτιβίνης B ήταν στατιστικά σημαντικά διαφορετικά μεταξύ των τριών ομάδων κυήσεων (p=0.01), με την διάμεση τιμή της ακτιβίνης B να είναι υψηλότερη στις γυναίκες με έκτοπη κύηση (268pg/ml) σε σχέση με τις γυναίκες με φυσιολογική ενδομήτρια κύηση (119pg/ml, p=0.005), όπως και υψηλότερα ήταν τα επίπεδα της ακτιβίνης B στις γυναίκες με παλίνδρομο κύηση (224pg/ml) σε σχέση με τις φυσιολογικές ενδομήτριες κυήσεις (119pg/ml, p=0.03), ενώ η ακτιβίνη B δεν βρέθηκε να διαφέρει σημαντικά μεταξύ των έκτοπων και των παλίνδρομων κυήσεων. Επιπλέον, τα επίπεδα της ακτιβίνης B συνολικά βρέθηκαν να έχουν στατιστικά σημαντική μικρή συσχέτιση με τα επίπεδα της προγεστερόνης (n=48,  $\rho=-0.327$ , p=0.02), όπου όταν διερευνήθηκαν σε κάθε ομάδα χωριστά (έκτοπες, παλίνδρομες, φυσιολογικές κυήσεις) δεν αποκάλυψαν καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση, υποδηλώνοντας ότι ενδεχομένως η

προγεστερόνη να μην σχετίζεται με την παρατηρούμενη διακύμανση στα επίπεδα της ακτιβίνης B.

Περαιτέρω, βρέθηκε ότι η ακτιβίνη B μπορούσε να διακρίνει μία έκτοπο κύηση σε σχέση με μία φυσιολογική ενδομήτρια κύηση με ευαισθησία 88.9% και ειδικότητα 76.5%, όταν τα επίπεδά της ήταν μεγαλύτερα από 145pg/ml ( $AUC=0.799, p=0.005$ ), όπως και να διακρίνει μία παλίνδρομη κύηση σε σχέση με μία ενδομήτρια κύηση ( $AUC=0.724, p=0.03$ , ευαισθησία 76.5%, ειδικότητα 76.9%, διαχωριστική τιμή 145pg/ml), χωρίς όμως ωστόσο να μπορεί να διαχωρίσει μία έκτοπο από μία παλίνδρομη κύηση. Συνολικά, η ακτιβίνη μπορούσε να διακρίνει μία φυσιολογική ενδομήτρια κύηση σε σχέση με εκδράμους κυήσεις (έκτοπες και παλίνδρομες) με ευαισθησία 82.9% και ειδικότητα 76.9%, όταν η τιμή της ήταν μικρότερη από 145pg/ml ( $AUC= 0.763, p=0.006$ ).

Ο λόγος για τον οποίο τα επίπεδα της ακτιβίνης B στην παρούσα εργασία είναι διαφορετικά στον ορό γυναικών με έκτοπο, παλίνδρομη και φυσιολογική ενδομήτρια κύηση σε σχέση με αυτά που έχουν αναφερθεί από τους *Horne et.al.*(2008) είναι άγνωστος, και είναι πιθανόν όπως έχει αναφερθεί και για πολλούς άλλους βιοδείκτες με αντικρουόμενα αποτελέσματα μεταξύ των διαφορετικών μελετών, οι διακυμάνσεις που παρατηρούνται στα επίπεδα των βιοδεικτών να οφείλονται στην έμφυτη ετερογένεια της παθογένειας που οδηγεί στην εκδήλωση των έκτοπων και των παλίνδρομων κυήσεων (Senapati and Barnhart 2013; Shaw, et al. 2012). Επιπλέον, καθώς ήδη έχει παρατηρηθεί μεγάλη ετερογένεια στις μετρήσεις της ακτιβίνης B σε δείγματα ορού ανάλογα με τα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια, ένας παράγοντας που μπορεί να επηρεάζει τα αποτελέσματα είναι και ο διαφορετικός τρόπος ανίχνευσης (Ludlow, et al. 2009).

Δεχόμενοι ωστόσο το δεδομένο των *Horne et.al.*(2008) ότι η ακτιβίνη B ενδέχεται να συσχετίζεται με το βαθμό φθαρτοποίησης του ενδομητρίου, θα μπορούσε να υποτεθεί ότι τα υψηλότερα επίπεδα που ανιχνεύτηκαν στην παρούσα εργασία στις γυναίκες με έκτοπο και παλίνδρομη κύηση σε σχέση με τις ενδομήτριες κυήσεις, θα μπορούσαν να οφείλονται σε μία διαταραγμένη φθαρτοποίηση, χωρίς ωστόσο να μπορεί να προσδιοριστεί εάν τα υψηλά επίπεδα της ακτιβίνης B είναι η αιτία είτε το αποτέλεσμα της διαταραγμένης αυτής φθαρτοποίησης. Καθώς η ακτιβίνη B έχει βρεθεί να επάγεται από καταστάσεις φλεγμονής, συμμετέχοντας ενδεχομένως στην φάση επίλυσης της φλεγμονής (Hedger and de Kretser 2013; Phillips, et al. 2009), είναι πιθανόν τα αυξημένα επίπεδα της ακτιβίνης B που παρατηρήθηκαν στις γυναίκες με έκτοπο και παλίνδρομο κύηση να οφείλονται στην προσπάθεια επίλυσης μιας προ-υπάρχουσας φλεγμονής που να ενυπήρχε στις ασθενείς που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη, ενώ να απουσίαζε από το δείγμα των γυναικών που μελετήθηκε από τους *Horne et.al.*(2008). Επιπλέον, αν και τα επίπεδα της οιστραδιόλης είναι άγνωστα και στις δύο μελέτες, καθώς η έκφραση της ακτιβίνης B έχει αναφερθεί να μειώνεται από την δράση της οιστραδιόλης σε καρκινικά κύτταρα μαστού (Burdette and Woodruff 2007), εάν η δράση της οιστραδιόλης σε σχέση με την ακτιβίνη B βρεθεί να είναι να είναι παρόμοια και στα κύτταρα του ενδομητρίου, θα μπορούσε να υποτεθεί ότι τα υψηλά επίπεδα της ακτιβίνης B που παρατηρήθηκαν στην εργασία αυτή, στις γυναίκες με έκτοπο και παλίνδρομη κύηση, ενδέχεται να οφείλονται σε μειωμένα επίπεδα οιστραδιόλης σε σχέση με τις φυσιολογικές ενδομήτριες κυήσεις.

Αν και ο συσχετισμός ενός βιοδείκτη με το βιολογικό μονοπάτι που οδηγεί στην παθογένεια δεν είναι προαπαιτούμενο για την κλινική χρήση του (Palmer and Barnhart 2013), καθώς τα δεδομένα που αφορούν τη δράση της ακτιβίνης B είναι ελάχιστα, περαιτέρω στοιχεία που να διευκρινίζουν τις βιολογικές δράσεις της θα μπορούσαν να βοηθήσουν ενδεχομένως στην επιλογή ασθενών στους οποίους η διαγνωστική της ικανότητα να είναι περισσότερο χρήσιμη. Επιπλέον, ο συνδυασμός της ακτιβίνης με άλλους βιοδείκτες που έχουν δώσει υποσχόμενα



αποτελέσματα όπως η ακτιβίνη Α και ο VEGF (Refaat 2014; Senapati and Barnhart 2013), θα μπορούσε να αυξήσει ενδεχομένως τη διαγνωστική της ικανότητα. Καθώς ωστόσο η ανίχνευση της ακτιβίνης Β σε δείγματα ορού έχει παρουσιάσει αντικρουόμενα αποτελέσματα με βάση τα αντιδραστήρια που έχουν χρησιμοποιηθεί (Ludlow, et al. 2009), προσοχή συνιστάται σε μελλοντικές μελέτες, ώστε να χρησιμοποιηθούν αντιδραστήρια που να δίνουν συνεπή και συγκρίσιμα αποτελέσματα.

Συμπερασματικά, η παρούσα εργασία κατέδειξε ότι η ακτιβίνη Β είναι ένας υποσχόμενος βιοδείκτης για τον διαχωρισμό έκτοπων και παλίνδρομων κυήσεων σε σχέση με τις φυσιολογικές ενδομήτριες, του οποίου η διαγνωστική ικανότητα θα μπορούσε ενδεχομένως να αυξηθεί με την ταυτόχρονη χρήση και άλλων βιοδεικτών, οδηγώντας στον κλινικά χρήσιμο και πολυπύλοτο διαχωρισμό των έκτοπων κυήσεων σε σχέση με τις παλίνδρομες κυήσεις.

## Βιβλιογραφία

- Achache, H., and A. Revel  
2006 Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update* 12(6):731-46.
- Antenos, M., et al.  
2011 Role of PCSK5 expression in mouse ovarian follicle development: identification of the inhibin alpha- and beta-subunits as candidate substrates. *PLoS One* 6(3):e17348.
- Antenos, M., et al.  
2007 N-linked oligosaccharides direct the differential assembly and secretion of inhibin alpha- and betaA-subunit dimers. *Mol Endocrinol* 21(7):1670-84.
- Antenos, M., et al.  
2008 An activin/furin regulatory loop modulates the processing and secretion of inhibin alpha- and betaB-subunit dimers in pituitary gonadotrope cells. *J Biol Chem* 283(48):33059-68.
- Aplin, J. D., and S. J. Kimber  
2004 Trophoblast-uterine interactions at implantation. *Reprod Biol Endocrinol* 2:48.
- Barakat, B., et al.  
2012 Activins and inhibins in mammalian testis development: new models, new insights. *Mol Cell Endocrinol* 359(1-2):66-77.
- Barkehall-Thomas, A., et al.  
2006 Maternal serum activin A and the prediction of intrauterine growth restriction. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 46(2):97-101.
- Barnhart, K. T.  
2009 Clinical practice. Ectopic pregnancy. *N Engl J Med* 361(4):379-87.
- Barnhart, K., et al.  
2011 Pregnancy of unknown location: a consensus statement of nomenclature, definitions, and outcome. *Fertil Steril* 95(3):857-66.
- Bearfield, C., et al.  
2005 The secretion and effect of inhibin A, activin A and follistatin on first-trimester trophoblasts in vitro. *Eur J Endocrinol* 152(6):909-16.
- Beckett, M. C., et al.  
2015 The transmembrane heparan sulphate proteoglycan syndecan-4 is involved in establishment of the lamellar structure of the annulus fibrosus of the intervertebral disc. *Eur Cell Mater* 30:69-88.
- Bilezikjian, L. M., et al.  
2012 Cell-type specific modulation of pituitary cells by activin, inhibin and follistatin. *Mol Cell Endocrinol* 359(1-2):43-52.

- Blauer, M., et al.  
1996 Measurement of activin B in human saliva and localization of activin subunits in rat salivary glands. *Biochem Biophys Res Commun* 222(2):230-5.
- Blois, S. M., B. F. Klapp, and G. Barrientos  
2011 Decidualization and angiogenesis in early pregnancy: unravelling the functions of DC and NK cells. *J Reprod Immunol* 88(2):86-92.
- Bosch, J. A.  
2014 The use of saliva markers in psychobiology: mechanisms and methods. *Monogr Oral Sci* 24:99-108.
- Bottomley, C., and T. Bourne  
2009 Diagnosing miscarriage. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 23(4):463-77.
- Bourne, T., and C. Bottomley  
2012 When is a pregnancy nonviable and what criteria should be used to define miscarriage? *Fertil Steril* 98(5):1091-6.
- Brady, P., et al.  
2014 Pregnancies of unknown location after in vitro fertilization: minimally invasive management with Karman cannula aspiration. *Fertil Steril* 101(2):420-6.
- Brasso, K., and K. V. Strom  
1991 [Abdominal pregnancy with a living infant]. *Ugeskr Laeger* 153(22):1593-4.
- Brewster, E. M., Sr., E. A. Braithwaite, and E. M. Brewster, Jr.  
2011 Advanced abdominal pregnancy: a case report of good maternal and perinatal outcome. *West Indian Med J* 60(5):587-9.
- Broekmans, F. J., M. R. Soules, and B. C. Fauser  
2009 Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. *Endocr Rev* 30(5):465-93.
- Brunton, P. J.  
2013 Effects of maternal exposure to social stress during pregnancy: consequences for mother and offspring. *Reproduction* 146(5):R175-89.
- Burdette, J. E., and T. K. Woodruff  
2007 Activin and estrogen crosstalk regulates transcription in human breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 14(3):679-89.
- Butler, C. M., E. J. Gold, and G. P. Risbridger  
2005 Should activin betaC be more than a fading snapshot in the activin/TGFbeta family album? *Cytokine Growth Factor Rev* 16(4-5):377-85.
- Cabar, Fabio Roberto, et al.  
2008 Serum markers in the diagnosis of tubal pregnancy. *Clinics* 63(5):701-708.
- Carreira, A. C., et al.  
2014 Bone Morphogenetic Proteins: structure, biological function and therapeutic applications. *Arch Biochem Biophys* 561:64-73.
- Cartwright, J., et al.  
2009 Serum biomarkers of tubal ectopic pregnancy: current candidates and future possibilities. *Reproduction* 138(1):9-22.
- Cavagna, M., and J. C. Mantese  
2003 Biomarkers of Endometrial Receptivity—A Review. *Placenta* 24:S39-S47.
- Chen, J. L., et al.  
2014a Elevated expression of activins promotes muscle wasting and cachexia. *FASEB J* 28(4):1711-23.
- Chen, X., et al.  
2014b Alpha-2-macroglobulin as a radioprotective agent: a review. *Chin J Cancer Res* 26(5):611-21.
- Condous, G., et al.  
2006 Failing pregnancies of unknown location: a prospective evaluation of the human chorionic gonadotrophin ratio. *BJOG* 113(5):521-7.
- Cookingham, L. M., et al.  
2015 Successful treatment algorithm for evaluation of early pregnancy after in vitro fertilization. *Fertil Steril*.
- Crow, J., et al.  
1994 Morphology and ultrastructure of fallopian tube epithelium at different stages of the menstrual cycle and menopause. *Hum Reprod* 9(12):2224-33.

- Daponte, A., et al.  
2013 Activin A and follistatin as biomarkers for ectopic pregnancy and missed abortion. *Dis Markers* 35(5):497-503.
- de Kretser, D. M., et al.  
2013 Serum activin A and B levels predict outcome in patients with acute respiratory failure: a prospective cohort study. *Crit Care* 17(5):R263.
- de Kretser, D. M., et al.  
2012 The roles of activin A and its binding protein, follistatin, in inflammation and tissue repair. *Mol Cell Endocrinol* 359(1-2):101-6.
- Di Spiezo Sardo, A., et al.  
2004 Chronic ectopic pregnancy diagnosed incidentally in an infertile woman: a case report. *J Reprod Med* 49(12):992-6.
- Dighe, M., et al.  
2008 Sonography in first trimester bleeding. *J Clin Ultrasound* 36(6):352-66.
- Doubilet, P. M., et al.  
2013 Diagnostic criteria for nonviable pregnancy early in the first trimester. *N Engl J Med* 369(15):1443-51.
- Drummond, A. E., and P. J. Fuller  
2012 Activin and inhibin, estrogens and NFkappaB, play roles in ovarian tumourigenesis is there crosstalk? *Mol Cell Endocrinol* 359(1-2):85-91.
- Duncan, W. C., et al.  
2011 Ectopic pregnancy as a model to identify endometrial genes and signaling pathways important in decidualization and regulated by local trophoblast. *PLoS One* 6(8):e23595.
- Eyal, O., et al.  
2007 Autocrine prolactin inhibits human uterine decidualization: a novel role for prolactin. *Biol Reprod* 76(5):777-83.
- Ezzati, M., et al.  
2014 Tubal transport of gametes and embryos: a review of physiology and pathophysiology. *J Assist Reprod Genet* 31(10):1337-47.
- Fang, Y., et al.  
2009 MDM2 309 polymorphism is associated with missed abortion. *Hum Reprod* 24(6):1346-9.
- Ferreira, M. C., et al.  
2008 Activin A increases invasiveness of endometrial cells in an in vitro model of human peritoneum. *Mol Hum Reprod* 14(5):301-7.
- Florio, P., et al.  
2010a Evaluation of endometrial activin A secretion for prediction of pregnancy after intrauterine insemination. *Fertil Steril* 93(7):2316-20.
- Florio, P., et al.  
2010b Activins and related proteins in the establishment of pregnancy. *Reprod Sci* 17(4):320-30.
- Florio, P., et al.  
2011 Serum activin A levels are lower in tubal than intrauterine spontaneously conceived pregnancies. *Gynecol Endocrinol* 27(6):391-5.
- Florio, P., et al.  
2007a Interleukin 1beta and progesterone stimulate activin a expression and secretion from cultured human endometrial stromal cells. *Reprod Sci* 14(1):29-36.
- Florio, P., et al.  
2007b Single serum activin a testing to predict ectopic pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 92(5):1748-53.
- Fortin, J., et al.  
2015 Minireview: Activin Signaling in Gonadotropes: What Does the FOX say... to the SMAD? *Mol Endocrinol* 29(7):963-77.
- Fowler, P. A., et al.  
1998 A longitudinal study of maternal serum inhibin-A, inhibin-B, activin-A, activin-AB, pro-alphaC and follistatin during pregnancy. *Hum Reprod* 13(12):3530-6.
- Fritz, R., C. Jain, and D. R. Armant  
2014 Cell signaling in trophoblast-uterine communication. *Int J Dev Biol* 58(2-4):261-71.

- Fu, G., et al.  
2013 MicroRNA-376c impairs transforming growth factor-beta and nodal signaling to promote trophoblast cell proliferation and invasion. *Hypertension* 61(4):864-72.
- Gaide Chevonnay, H. P., et al.  
2012 Regulation of matrix metalloproteinases activity studied in human endometrium as a paradigm of cyclic tissue breakdown and regeneration. *Biochim Biophys Acta* 1824(1):146-56.
- Gellersen, B., et al.  
2010 Invasiveness of human endometrial stromal cells is promoted by decidualization and by trophoblast-derived signals. *Hum Reprod* 25(4):862-73.
- Gemzell-Danielsson, K., et al.  
2007 Misoprostol to treat missed abortion in the first trimester. *Int J Gynaecol Obstet* 99 Suppl 2:S182-5.
- Gilman Barber, A. R., S. A. Rhone, and M. R. Fluker  
2014 Curettage and Asherman's syndrome-lessons to (re-) learn? *J Obstet Gynaecol Can* 36(11):997-1001.
- Gold, E., and G. Risbridger  
2012 Activins and activin antagonists in the prostate and prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol* 359(1-2):107-12.
- Graham, Anna, Sangeetha Devarajan, and Shreelata Datta  
2015 Complications in early pregnancy. *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine* 25(1):1-5.
- Halbert, S. A., et al.  
1997 Function and structure of cilia in the fallopian tube of an infertile woman with Kartagener's syndrome. *Hum Reprod* 12(1):55-8.
- Hashimoto, O., et al.  
2002 cDNA cloning and expression of human activin betaE subunit. *Mol Cell Endocrinol* 194(1-2):117-22.
- Hawkins, S. M., and M. M. Matzuk  
2008 The menstrual cycle: basic biology. *Ann N Y Acad Sci* 1135:10-8.
- Hedger, M. P., and D. M. de Kretser  
2013 The activins and their binding protein, follistatin-Diagnostic and therapeutic targets in inflammatory disease and fibrosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 24(3):285-95.
- Hedger, M. P., and W. R. Winnall  
2012 Regulation of activin and inhibin in the adult testis and the evidence for functional roles in spermatogenesis and immunoregulation. *Mol Cell Endocrinol* 359(1-2):30-42.
- Henriet, P., H. P. Gaide Chevonnay, and E. Marbaix  
2012 The endocrine and paracrine control of menstruation. *Mol Cell Endocrinol* 358(2):197-207.
- Hillier, S. G.  
2009 Paracrine support of ovarian stimulation. *Mol Hum Reprod* 15(12):843-50.
- Hormanseder, E., T. Tischer, and T. U. Mayer  
2013 Modulation of cell cycle control during oocyte-to-embryo transitions. *EMBO J* 32(16):2191-203.
- Horne, A. W., and C. I. Alexander  
2005 Recurrent miscarriage. *J Fam Plann Reprod Health Care* 31(2):103-7.
- Horne, A. W., W. C. Duncan, and H. O. Critchley  
2010 The need for serum biomarker development for diagnosing and excluding tubal ectopic pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 89(3):299-301.
- Horne, A. W., et al.  
2008 Endometrial inhibin/activin beta-B subunit expression is related to decidualization and is reduced in tubal ectopic pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 93(6):2375-82.
- Hotten, G., et al.  
1994 Cloning and expression of recombinant human growth/differentiation factor 5. *Biochem Biophys Res Commun* 204(2):646-52.

- Huppertz, B.  
2008 Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. *Hypertension* 51(4):970-5.
- Huppertz, B., D. Ghosh, and J. Sengupta  
2014 An integrative view on the physiology of human early placental villi. *Prog Biophys Mol Biol* 114(1):33-48.
- Imamura, T., Y. Oshima, and A. Hikita  
2013 Regulation of TGF-beta family signalling by ubiquitination and deubiquitination. *J Biochem* 154(6):481-9.
- Ji, L., et al.  
2013 Placental trophoblast cell differentiation: physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia. *Mol Aspects Med* 34(5):981-1023.
- Jin, J. M., and W. X. Yang  
2014 Molecular regulation of hypothalamus-pituitary-gonads axis in males. *Gene* 551(1):15-25.
- Jones, R. L., et al.  
2006a Activin A and inhibin A differentially regulate human uterine matrix metalloproteinases: potential interactions during decidualization and trophoblast invasion. *Endocrinology* 147(2):724-32.
- Jones, R. L., J. K. Findlay, and L. A. Salamonsen  
2006b The role of activins during decidualisation of human endometrium. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 46(3):245-9.
- Jones, R. L., L. A. Salamonsen, and J. K. Findlay  
2002 Potential roles for endometrial inhibins, activins and follistatin during human embryo implantation and early pregnancy. *Trends Endocrinol Metab* 13(4):144-50.
- Jones, R. L., et al.  
2006c TGF-beta superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. *Reproduction* 132(2):217-32.
- Kaitu'u-Lino, T. J., et al.  
2009 A new role for activin in endometrial repair after menses. *Endocrinology* 150(4):1904-11.
- Keah, H. H., and M. T. Hearn  
2005 A molecular recognition paradigm: promiscuity associated with the ligand-receptor interactions of the activin members of the TGF-beta superfamily. *J Mol Recognit* 18(5):385-403.
- Keelan, J. A., N. P. Groome, and M. D. Mitchell  
1998 Regulation of activin-A production by human amnion, decidua and placenta in vitro by pro-inflammatory cytokines. *Placenta* 19(5-6):429-34.
- Kelber, J. A., et al.  
2008 Cripto is a noncompetitive activin antagonist that forms analogous signaling complexes with activin and nodal. *J Biol Chem* 283(8):4490-500.
- Kirk, E., C. Bottomley, and T. Bourne  
2014 Diagnosing ectopic pregnancy and current concepts in the management of pregnancy of unknown location. *Hum Reprod Update* 20(2):250-61.
- Kirk, E., G. Condous, and T. Bourne  
2009a Pregnancies of unknown location. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 23(4):493-9.
- Kirk, E., et al.  
2013 Intramural ectopic pregnancy: a case and review of the literature. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 168(2):129-33.
- Kirk, E., et al.  
2009b The use of serum inhibin A and activin A levels in predicting the outcome of 'pregnancies of unknown location'. *Hum Reprod* 24(10):2451-6.
- Kirk, Emma, and Tom Bourne  
2011 Ectopic pregnancy. *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine* 21(7):207-211.
- Knight, P. G., and C. Glister  
2001 Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. *Reproduction* 121(4):503-12.

- Knight, P. G., L. Satchell, and C. Glister  
2012 Intra-ovarian roles of activins and inhibins. *Mol Cell Endocrinol* 359(1-2):53-65.
- Kolte, A. M., et al.  
2015 Terminology for pregnancy loss prior to viability: a consensus statement from the ESHRE early pregnancy special interest group. *Hum Reprod* 30(3):495-8.
- Kwiatkowski, W., P. C. Gray, and S. Choe  
2014 Engineering TGF-beta superfamily ligands for clinical applications. *Trends Pharmacol Sci* 35(12):648-57.
- Larsen, E. C., et al.  
2013 New insights into mechanisms behind miscarriage. *BMC Med* 11:154.
- Lee, M. L., et al.  
2014 Live full-term ovarian ectopic pregnancy: a case report. *J Reprod Med* 59(11-12):607-10.
- Leese, H. J., et al.  
2001 Formation of Fallopian tubal fluid: role of a neglected epithelium. *Reproduction* 121(3):339-46.
- Levine, D.  
2014 Waiting, not rushing, to diagnose a failed pregnancy. *Ultrasound Q* 30(1):11-2.
- Li, Yan, et al.  
2013 Activin A, B and AB increase human trophoblast cell invasion by up-regulating N-cadherin. *Placenta* 34(9):A49.
- Lim, R., et al.  
2015 Activin and NADPH-oxidase in preeclampsia: insights from in vitro and murine studies. *Am J Obstet Gynecol* 212(1):86 e1-12.
- Linko, R., et al.  
2014 Serum activin A and B, and follistatin in critically ill patients with influenza A(H1N1) infection. *BMC Infect Dis* 14:253.
- Loomans, H. A., and C. D. Andl  
2014 Intertwining of Activin A and TGFbeta Signaling: Dual Roles in Cancer Progression and Cancer Cell Invasion. *Cancers (Basel)* 7(1):70-91.
- Ludlow, H., et al.  
2009 A new 'total' activin B enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): development and validation for human samples. *Clin Endocrinol (Oxf)* 71(6):867-73.
- Luisi, S., et al.  
2005 Inhibins in female and male reproductive physiology: role in gametogenesis, conception, implantation and early pregnancy. *Hum Reprod Update* 11(2):123-35.
- Lyons, R. A., E. Saridogan, and O. Djahanbakhch  
2006 The reproductive significance of human Fallopian tube cilia. *Hum Reprod Update* 12(4):363-72.
- Makanji, Y., et al.  
2014 Inhibin at 90: from discovery to clinical application, a historical review. *Endocr Rev* 35(5):747-94.
- Mandang, S., U. Manuelpillai, and E. M. Wallace  
2007 Oxidative stress increases placental and endothelial cell activin A secretion. *J Endocrinol* 192(3):485-93.
- Marion, L. L., and G. R. Meeks  
2012 Ectopic pregnancy: History, incidence, epidemiology, and risk factors. *Clin Obstet Gynecol* 55(2):376-86.
- Matzuk, M. M., and D. J. Lamb  
2008 The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat Med* 14(11):1197-213.
- McDowall, M., et al.  
2008 The role of activins and follistatins in skin and hair follicle development and function. *Cytokine Growth Factor Rev* 19(5-6):415-26.
- McLennan, I. S., and M. W. Pankhurst  
2015 Anti-Mullerian hormone is a gonadal cytokine with two circulating forms and cryptic actions. *J Endocrinol* 226(3):R45-57.

- McNeilly, A. S.  
2012 Diagnostic applications for inhibin and activins. *Mol Cell Endocrinol* 359(1-2):121-5.
- Medan, Mohamed S., et al.  
2007 Inhibin: Regulation of reproductive function and practical use in females. *Animal Science Journal* 78(1):16-27.
- Menkhorst, E., et al.  
2010 Interleukin 11 and activin A synergise to regulate progesterone-induced but not cAMP-induced decidualization. *J Reprod Immunol* 84(2):124-32.
- Messinis, I. E.  
2006 Ovarian feedback, mechanism of action and possible clinical implications. *Hum Reprod Update* 12(5):557-71.
- Mihm, M., S. Gangooly, and S. Muttukrishna  
2011 The normal menstrual cycle in women. *Anim Reprod Sci* 124(3-4):229-36.
- Morpurgo, P. S., et al.  
2004 Circulating levels of inhibin A, inhibin B and activin A in normal and intrauterine growth restricted (IUGR) fetuses. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 117(1):38-44.
- Muttukrishna, S., et al.  
2004a Inhibin, activin, follistatin, activin receptors and beta-glycan gene expression in the villous tissue of miscarriage patients. *Mol Hum Reprod* 10(11):793-8.
- Muttukrishna, S., et al.  
1996 Changes in peripheral serum levels of total activin A during the human menstrual cycle and pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 81(9):3328-34.
- Muttukrishna, S., et al.  
2004b Activin and follistatin in female reproduction. *Mol Cell Endocrinol* 225(1-2):45-56.
- Mylonas, I., et al.  
2010 Evidence of inhibin/activin subunit betaC and betaE synthesis in normal human endometrial tissue. *Reprod Biol Endocrinol* 8:143.
- Mylonas, I., et al.  
2004 Inhibin/activin subunits alpha, beta-A and beta-B are differentially expressed in normal human endometrium throughout the menstrual cycle. *Histochem Cell Biol* 122(5):461-71.
- Ngoc, N. T., et al.  
2004 Medical treatment of missed abortion using misoprostol. *Int J Gynaecol Obstet* 87(2):138-42.
- Nisenblat, V., et al.  
2005 Primary ovarian ectopic pregnancy misdiagnosed as first-trimester missed abortion. *J Ultrasound Med* 24(4):539-43; quiz 544-5.
- Oliver, A., and C. Overton  
2014 Diagnosis and management of miscarriage. *Practitioner* 258(1771):25-8, 3.
- Oron, G., and T. Tulandi  
2013 A pragmatic and evidence-based management of ectopic pregnancy. *J Minim Invasive Gynecol* 20(4):446-54.
- Palmer, S. S., and K. T. Barnhart  
2013 Biomarkers in reproductive medicine: the promise, and can it be fulfilled? *Fertil Steril* 99(4):954-62.
- Pepe, M. S., et al.  
2001 Phases of biomarker development for early detection of cancer. *J Natl Cancer Inst* 93(14):1054-61.
- Perrier d'Hauterive, S., et al.  
2005 Human endometrial leukemia inhibitory factor and interleukin-6: control of secretion by transforming growth factor-beta-related members. *Neuroimmunomodulation* 12(3):157-63.
- Petraglia, F., et al.  
1995 Hypertension in pregnancy: changes in activin A maternal serum concentration. *Placenta* 16(5):447-54.



- Phillips, D. J., and D. M. de Kretser  
1998 Follistatin: a multifunctional regulatory protein. *Front Neuroendocrinol* 19(4):287-322.
- Phillips, D. J., D. M. de Kretser, and M. P. Hedger  
2009 Activin and related proteins in inflammation: not just interested bystanders. *Cytokine Growth Factor Rev* 20(2):153-64.
- Plaisier, M.  
2011 Decidualisation and angiogenesis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 25(3):259-71.
- Prakash, A., et al.  
2006 A study of luteal phase expression of inhibin, activin, and follistatin subunits in the endometrium of women with recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 86(6):1723-30.
- Prakash, A., et al.  
2008 A preliminary study comparing the endometrial expression of inhibin, activin and follistatin in women with a history of implantation failure after IVF treatment and a control group. *BJOG* 115(4):532-6; discussion 536-7.
- Qu, J., and K. Thomas  
1998 Advance in the study of inhibin, activin and follistatin production in pregnant women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 81(2):141-8.
- Rai, Raj, and Lesley Regan  
2006 Recurrent miscarriage. *The Lancet* 368(9535):601-611.
- Rana, P., et al.  
2013 Ectopic pregnancy: a review. *Arch Gynecol Obstet* 288(4):747-57.
- Rausch, M. E., and K. T. Barnhart  
2012 Serum biomarkers for detecting ectopic pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* 55(2):418-23.
- Rausch, M. E., et al.  
2011 Development of a multiple marker test for ectopic pregnancy. *Obstet Gynecol* 117(3):573-82.
- Refaat, B.  
2014 Role of activins in embryo implantation and diagnosis of ectopic pregnancy: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 12:116.
- Refaat, B., et al.  
2009 Role of activins and inducible nitric oxide in the pathogenesis of ectopic pregnancy in patients with or without Chlamydia trachomatis infection. *Clin Vaccine Immunol* 16(10):1493-503.
- Refaat, B., et al.  
2008 The expression of activin-betaA- and -betaB-subunits, follistatin, and activin type II receptors in fallopian tubes bearing an ectopic pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 93(1):293-9.
- Refaat, B., E. Dalton, and W. L. Ledger  
2015 Ectopic pregnancy secondary to in vitro fertilisation-embryo transfer: pathogenic mechanisms and management strategies. *Reprod Biol Endocrinol* 13:30.
- Refaat, B., et al.  
2014 Serum Activins and Follistatin during the Treatment of Chronic Hepatitis C Genotypes 1 and 4 and Their Correlations with Viral Load and Liver Enzymes: A Preliminary Report. *Gastroenterol Res Pract* 2014:628683.
- Refaat, B., and W. Ledger  
2011 The expression of activins, their type II receptors and follistatin in human Fallopian tube during the menstrual cycle and in pseudo-pregnancy. *Hum Reprod* 26(12):3346-54.
- Refaat, B., et al.  
2012 Why does the fallopian tube fail in ectopic pregnancy? The role of activins, inducible nitric oxide synthase, and MUC1 in ectopic implantation. *Fertil Steril* 97(5):1115-23.
- Rehman, A. A., H. Ahsan, and F. H. Khan  
2013 alpha-2-Macroglobulin: a physiological guardian. *J Cell Physiol* 228(8):1665-75.

- Reid, S., and G. Condous  
2012 Is there a need to definitively diagnose the location of a pregnancy of unknown location? The case for "no". *Fertil Steril* 98(5):1085-90.
- Richardson, A., et al.  
2015 Accuracy of first trimester ultrasound features for diagnosis of tubal ectopic pregnancy in the absence of an obvious extra-uterine embryo: A systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*.
- Robertson, D. M.  
2012 Inhibins and activins in blood: predictors of female reproductive health? *Mol Cell Endocrinol* 359(1-2):78-84.
- Roghaei, M. A., F. Sabet, and K. Mohamadi  
2012 Diagnostic accuracy of serum activin A in detection of ectopic pregnancy. *J Res Med Sci* 17(4):378-81.
- Rosenberg, V. A., et al.  
2012 Modulation of amniotic fluid activin-a and inhibin-a in women with preterm premature rupture of the membranes and infection-induced preterm birth. *Am J Reprod Immunol* 67(2):122-31.
- Rubal, L., and K. Chung  
2012 Do you need to definitively diagnose the location of a pregnancy of unknown location? The case for "yes". *Fertil Steril* 98(5):1078-84.
- Salleh, N., and N. Giribabu  
2014 Leukemia inhibitory factor: roles in embryo implantation and in nonhormonal contraception. *ScientificWorldJournal* 2014:201514.
- Santibanez, J. F., M. Quintanilla, and C. Bernabeu  
2011 TGF-beta/TGF-beta receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 121(6):233-51.
- Schneider-Kolsky, M. E., et al.  
2002 The distribution of activin and activin receptors in gestational tissues across human pregnancy and during labour. *Placenta* 23(4):294-302.
- Seeber, B. E.  
2012 What serial hCG can tell you, and cannot tell you, about an early pregnancy. *Fertil Steril* 98(5):1074-7.
- Senapati, S., and K. T. Barnhart  
2013 Biomarkers for ectopic pregnancy and pregnancy of unknown location. *Fertil Steril* 99(4):1107-16.
- Shaw, J. L., et al.  
2010 Current knowledge of the aetiology of human tubal ectopic pregnancy. *Hum Reprod Update* 16(4):432-44.
- Shaw, J. L., et al.  
2012 Ectopic pregnancy. *Clin Chem* 58(9):1278-85.
- Shaw, J. L., and A. W. Horne  
2012 The paracrinology of tubal ectopic pregnancy. *Mol Cell Endocrinol* 358(2):216-22.
- Shelling, A. N.  
2012 Mutations in inhibin and activin genes associated with human disease. *Mol Cell Endocrinol* 359(1-2):113-20.
- Sivalingam, V. N., et al.  
2011 Diagnosis and management of ectopic pregnancy. *J Fam Plann Reprod Health Care* 37(4):231-40.
- Stenvers, K. L., and J. K. Findlay  
2010 Inhibins: from reproductive hormones to tumor suppressors. *Trends Endocrinol Metab* 21(3):174-80.
- Stika, C. S.  
2012 Methotrexate: the pharmacology behind medical treatment for ectopic pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* 55(2):433-9.
- Stoikos, C. J., et al.  
2010 Activin A regulates trophoblast cell adhesive properties: implications for implantation failure in women with endometriosis-associated infertility. *Hum Reprod* 25(7):1767-74.

- Sur, S. D., and N. J. Raine-Fenning  
2009 The management of miscarriage. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 23(4):479-91.
- Tamminen, J. A., et al.  
2015 Overexpression of activin-A and -B in malignant mesothelioma - attenuated Smad3 signaling responses and ERK activation promote cell migration and invasive growth. *Exp Cell Res* 332(1):102-15.
- Tang, A. W., and S. Quenby  
2010 Recent thoughts on management and prevention of recurrent early pregnancy loss. *Curr Opin Obstet Gynecol* 22(6):446-51.
- Tang, O. S., K. Gemzell-Danielsson, and P. C. Ho  
2007 Misoprostol: pharmacokinetic profiles, effects on the uterus and side-effects. *Int J Gynaecol Obstet* 99 Suppl 2:S160-7.
- Tang, O. S., and P. C. Ho  
2006 The use of misoprostol for early pregnancy failure. *Curr Opin Obstet Gynecol* 18(6):581-6.
- Tay, J. I., J. Moore, and J. J. Walker  
2000 Ectopic pregnancy. *West J Med* 173(2):131-4.
- Tessier, C., et al.  
2003 Decidual activin: its role in the apoptotic process and its regulation by prolactin. *Biol Reprod* 68(5):1687-94.
- Thackray, V. G., P. L. Mellon, and D. Coss  
2010 Hormones in synergy: regulation of the pituitary gonadotropin genes. *Mol Cell Endocrinol* 314(2):192-203.
- Thompson, T. B., et al.  
2004 Beta A versus beta B: is it merely a matter of expression? *Mol Cell Endocrinol* 225(1-2):9-17.
- Thulluru, H. K., et al.  
2015 ACVR2A promoter polymorphism rs1424954 in the Activin-A signaling pathway in trophoblasts. *Placenta* 36(4):345-9.
- Tirado-Rodriguez, B., et al.  
2014 TGF- beta: an important mediator of allergic disease and a molecule with dual activity in cancer development. *J Immunol Res* 2014:318481.
- Tong, S., E. M. Wallace, and H. G. Burger  
2003 Inhibins and activins: clinical advances in reproductive medicine. *Clin Endocrinol (Oxf)* 58(2):115-27.
- Trombly, D. J., T. K. Woodruff, and K. E. Mayo  
2009 Roles for transforming growth factor beta superfamily proteins in early folliculogenesis. *Semin Reprod Med* 27(1):14-23.
- Tsuchida, K., et al.  
2009 Activin signaling as an emerging target for therapeutic interventions. *Cell Commun Signal* 7:15.
- Tuuri, T., et al.  
1994 The tissue distribution of activin beta A- and beta B-subunit and follistatin messenger ribonucleic acids suggests multiple sites of action for the activin-follistatin system during human development. *J Clin Endocrinol Metab* 78(6):1521-4.
- van Mello, N. M., et al.  
2013 Methotrexate or expectant management in women with an ectopic pregnancy or pregnancy of unknown location and low serum hCG concentrations? A randomized comparison. *Hum Reprod* 28(1):60-7.
- Vejda, S., et al.  
2002 Expression and dimerization of the rat activin subunits betaC and betaE: evidence for the formation of novel activin dimers. *J Mol Endocrinol* 28(2):137-48.
- Vihko, K. K., et al.  
1998 Activin B: detection by an immunoassay in human serum during ovarian stimulation and late pregnancy. *Hum Reprod* 13(4):841-6.
- Walton, K. L., Y. Mekanji, and C. A. Harrison  
2012 New insights into the mechanisms of activin action and inhibition. *Mol Cell Endocrinol* 359(1-2):2-12.

- Wang, H., and B. K. Tsang  
2007 Nodal signalling and apoptosis. *Reproduction* 133(5):847-53.
- Wang, L. L., et al.  
2014 Misdiagnosis and delayed diagnosis for ectopic and heterotopic pregnancies after in vitro fertilization and embryo transfer. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 34(1):103-7.
- Warda, H., et al.  
2014 Interstitial ectopic pregnancy: conservative surgical management. *JSLs* 18(2):197-203.
- Warrick, J., et al.  
2012 Serum activin A does not predict ectopic pregnancy as a single measurement test, alone or as part of a multi-marker panel including progesterone and hCG. *Clin Chim Acta* 413(7-8):707-11.
- Weimar, C. H., et al.  
2013 The motile and invasive capacity of human endometrial stromal cells: implications for normal and impaired reproductive function. *Hum Reprod Update* 19(5):542-57.
- Williamson, R. D., G. W. O'Keeffe, and L. C. Kenny  
2015 Activin signalling and pre-eclampsia: from genetic risk to pre-symptomatic biomarker. *Cytokine* 71(2):360-5.
- Woodruff, T. K., et al.  
1997 Activin A and follistatin are dynamically regulated during human pregnancy. *J Endocrinol* 152(2):167-74.
- Xia, Y., and A. L. Schneyer  
2009 The biology of activin: recent advances in structure, regulation and function. *J Endocrinol* 202(1):1-12.
- Yan, G., et al.  
2012 MicroRNA-145 suppresses mouse granulosa cell proliferation by targeting activin receptor IB. *FEBS Lett* 586(19):3263-70.
- Young, J. M., et al.  
2012 Activin B is produced early in antral follicular development and suppresses thecal androgen production. *Reproduction* 143(5):637-50.
- Zhang, J., F. Li, and Q. Sheng  
2008 Full-term abdominal pregnancy: a case report and review of the literature. *Gynecol Obstet Invest* 65(2):139-41.
- Zhao, B., and Y. G. Chen  
2014 Regulation of TGF-beta Signal Transduction. *Scientifica (Cairo)* 2014:874065.